OTTO SCHIMON

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS ROT GEFÄRBTER NIEDERER PILZE.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS ROT GEFÄRBTER NIEDERER PILZE.

Von der
K. Technischen Hochschule zu München
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der technischen Wissenschaften (Doktor-
:: Ingenieurs) genehmigte Dissertation. ::

Vorgelegt von
Dipl.-Ing. **OTTO SCHIMON**
aus München.

ACAD. INGEN. BIBL.

Referent:
Prof. Dr. Karl Giesenhagen.

Korreferent:
Prof. Dr. Carl J. Lintner.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 1911.

MÜNCHEN 1911.
Kgl. Hof-Buchdruckerei Kastner & Callwey, Finkenstrasse 2.

Meinem Vater

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung des Herrn Prof. Dr. H. Will, Vorsteher der physiologischen Abteilung der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München, im gärungschemischen Laboratorium der K. Technischen Hochschule in München begonnen und im physiologischen Laboratorium der Wissenschaftlichen Station für Brauerei vollendet.

Es sei mir gestattet auch an dieser Stelle meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Prof. Dr. H. Will und Herrn Prof. Dr. C. J. Lintner, für die mir in reichstem Maße zuteil gewordene Unterstützung meinen herzlichsten Dank zum Ausdruck zu bringen.

Inhalts-Uebersicht.

Seite

Einleitung 9

A. Allgemeine Morphologie 29

B. Spezielle Morphologie 32

Wachstumserscheinungen bei Anwendung flüssiger und fester Nährböden

I. Flüssige Nährböden

a) Tröpfchenkulturen 54

b) Wachstumserscheinungen in grösseren Mengen Nährflüssigkeit

1. Gehopfte Würze 61

2. Neutrales Hefenwasser 65

3. Hefenzuckerwasser 67

4. Heudekokt 67

5. Milch 73

6. Mineralische Nährlösung nach Elfving . . 74

7. Seewasser 76

8. Peptonlösung mit Zusatz von Äthylalkohol und von organischen Säuren 78

II. Feste Nährböden

a) Einzellkultur 80

b) Riesenkolonien 87

1. Würzegelatine 88

2. Kartoffelwassergelatine 97

3. Rübenwassergelatine 99

4. Kartoffeln 99

C. Biologisches und Physiologisches

I. Widerstandsfähigkeit der vier Organismen gegen Erhitzen 102

II. Wachstumsgrenzen bei höherer und niederer Temperatur 104

III. Entwicklungshemmung und Abtötung der vier Organismen durch Zusatz von Äthylalkohol zur Nährlösung 105

IV. Verhalten der vier Organismen gegen organische Säuren 107

V. Verhalten der vier Organismen gegen verschiedene Zucker 113

VI. Der rote Farbstoff 115

D. Kurze Zusammenfassung der durch die Untersuchung festgestellten Artmerkmale. Stellung der vier Pilze im System 119

Einleitung.

Schon seit langer Zeit haben Spaltpilze und Sproßpilze, deren Zellen entweder selbst gefärbt erscheinen oder bei geeigneter Zusammensetzung des Nährbodens in diesem eine Färbung veranlassen, die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt. Die Färbung ist mannigfacher Art. Hauptsächlich werden gelbe, rote in verschiedenen Abtönungen, seltener blaue und grüne Färbungen hervorgerufen. Die Literatur berichtet sogar von „schwarzen Hefen", die der Gruppe der nichtsporenbildenden Sproßpilze zugerechnet werden. Die größte Aufmerksamkeit erregten von jeher diejenigen Organismen, welche eine Rotfärbung hervorrufen. Einzelne dieser Arten drängen sich durch ihre, bei Massenentwicklung intensive Farbe dem Auge geradezu auf und haben schon zu den abenteuerlichsten Deutungen Veranlassung gegeben. Es sei hier nur an das durch den *Mikrococcus prodigiosus* Cohn veranlaßte sogenannte „Bluten der Hostien" und andere Erscheinungen erinnert.

Offenbar sind die rotgefärbten Sproßpilze in der Natur ziemlich weit verbreitet. Sie finden sich nicht selten auf in der Natur gegebenen Substraten, am häufigsten erscheinen jedoch gewisse Formen auf Stärkekleister und manchen Nährgelatinen. Trotzdem wissen wir aber noch recht wenig über ihre Morphologie und Physiologie sowie über ihre systematische Stellung. Der Hauptgrund für diese Tatsache mag wohl der sein, daß diesen Organismen, soweit bis jetzt bekannt, keine größere Bedeutung zukommt. Es

findet sich nur eine Angabe von Demme[5]), nach welcher ein in Milch und Käse vorkommender roter Sproßpilz, der von ihm *Saccharomyces ruber* benannt ist, wohl aber besser als *Torula rubra* zu bezeichnen wäre, die Ursache von Darmkatarrhen bei Kindern sein soll.

Ueber einen zweiten praktisch bedeutsamen Fall, in welchem Gerste, die mit einem mit roten Sproßpilzen stark durchsetzten Wasser geweicht worden war, ein mißfarbiges Darrmalz lieferte, berichtet Will[36]).

Die ersten in der Literatur mitgeteilten Beobachtungen an roten Sproßpilzen wurden von Fresenius gemacht, der darüber in seinen „Beiträgen zur Mycologie“[9]) berichtet. Der von ihm beschriebene Organismus bildete auf „gestandenem Stärkekleister runde, konvexe, rosenrote, schleimige Flecken, welche eine Größe von 0,5—1 mm und etwas darüber hatten“. Die Form der Zellen war oval und länglich elliptisch (Fig. 1), manchmal mehr zylindrisch; ihre Länge betrug $^1/_{120}$—$^1/_{90}$ mm. Es handelt sich also um eine Form, die in Bezug auf ihre Größe den Bierhefenzellen sehr nahe kommt. Meistens enthielten die Zellen zwei „Oeltröpfchen“. Größere als dreigliederige Sproßverbände beobachtete Fresenius nicht. Ueber die

Fig. 1. *Cryptococcus glutinis* Fresenius.

Morphologie dieses roten Sproßpilzes macht Fresenius keine weiteren Mitteilungen, sondern erörtert nur dessen systematische Stellung. Er stellte ihn zur „Gattung der Gärungspilze“ und gab ihm den Namen *Cryptococcus glutinis*. Der Gattungsname *Cryptococcus* war den Gärungspilzen von Kützing gegeben worden, und Fresenius behielt ihn bei, weil dieser Name die Priorität vor der Bezeichnung *Saccharomyces*, die später Schwann und Meyen für die Gärungspilze gebrauchten, habe.

Ferner berichtet Schröter[32]) im Jahre 1872 ganz kurz über eine „Rosahefe“, die auf Kartoffelscheiben

Fig. 2. *Saccharomyces glutinis* Cohn.

Schleimtröpfchen bildete. Die Zellen waren nach ihrer Form von der gewöhnlichen Bierhefe nicht zu unterscheiden. In älteren Kulturen nahmen die Zellen Kugelform an und wurden größer, frisch ausgesät sproßten sie und bildeten kleine, eiförmige Glieder wie Bierhefe (Fig. 2). „Die Zellen erschienen in Membran und Inhalt farblos.“

Cohn[2]) kommt dann später im gleichen Jahre etwas ausführlicher auf die von Schröter erwähnte Rosahefe zurück und erklärt sie für identisch mit *Cryptococcus glutinis* Fres.; er änderte den Namen in *Saccharomyces glutinis* um. Nach den von Fresenius und Cohn ihren Abhandlungen beigegebenen Zeichnungen (Fig. 1 und 2) darf jedoch ohne weiteres angenommen werden, daß die Formen, welche die beiden Forscher vor sich hatten, nicht identisch waren.

Fresenius bildet sehr deutlich die regelmäßig an den Polen der Zellen gelagerten Oeltröpfchen ab, während in der Zeichnung von Cohn in den Zellen zwar mehr oder weniger kreisrunde Räume abgegrenzt erscheinen, ob er aber damit Vacuolen oder Fetttropfen bezeichnen wollte, ist aus seiner Mitteilung, die sich überhaupt nur nebenbei mit dem roten Sproßpilz beschäftigt, nicht ersichtlich. Wahrscheinlicher ist, daß die von Cohn gekennzeichneten Inhaltsbestandteile Fett- oder Oeltröpfchen darstellen, die aber dann jedenfalls keine so regelmäßige Lagerung wie bei der von Fresenius beschriebenen Form zeigen.

Cohn gibt als Größe seines *Saccharomyces glutinis* 5:4 μ an. Die Zellen sind also unzweifelhaft kleiner als die des roten Sproßpilzes von Fresenius, die in ihrer Größe den Bierhefenzellen gleichkommen.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Formen besteht, soweit sich aus den vorliegenden Zeichnungen schließen läßt, noch darin, daß die von Fresenius beschriebene Form sehr langgestreckte und bisweilen kleinere zugespitzte Zellen, ähnlich wie bei den Apiculatusarten aufweist, während solche bei der von Cohn beschriebenen fehlen. Zu berücksichtigen ist allerdings bei allen aus älterer Zeit stammenden Beschreibungen, daß absolute Reinkulturen (Einzellkulturen) nicht vorlagen und auch nicht vorliegen konnten. Außerdem sind Form und Größe der Zellen bei den Sproßpilzen oft innerhalb weiter Grenzen veränderlich und dürfen deshalb nicht ohne weiteres als Unterscheidungsmerkmale benützt werden[37]). Immerhin sind gewisse Zellformen und Zellgrößen (Riesenzellen) für gewisse Sproßpilzarten charakteristisch.

Auf die Verschiedenheit der beiden Formen von Fresenius und Cohn hat schon Hansen[11]) hin-

gewiesen. Er selbst hat rot gefärbte Sproßpilze untersucht, die vielleicht drei Arten angehören. Hansen zweifelt nicht daran, daß eine der von ihm beschriebenen Arten mit *Saccharomyces glutinis* Cohn identisch ist. Sie zeichnet sich durch mehr oder weniger kugelförmige Gestalt der Zellen und durch ihre Kleinheit aus. Die zweite Art ist dagegen ein Saccharomycet, bildet also Sporen. Die dritte Art ist durch die Bildung von Keimschläuchen gekennzeichnet. Diese Keimschläuche entstehen, wenn die Zusammensetzung der Nährlösung ungünstig wird, und ebenso

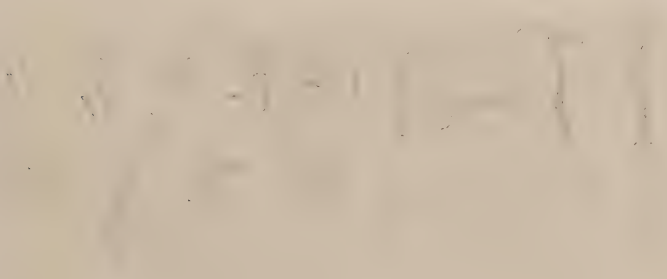


Fig. 3. Hansens rote Sprosspilze.

auf Substraten, auf welchen den Zellen nur Luft und Feuchtigkeit, aber keine Nahrung geboten wird. Werden die mit Keimschläuchen versehenen Zellen in eine frische Nährlösung gebracht, so sprossen sowohl die Keimschläuche, als auch die Mutterzellen wieder in der gewöhnlichen Weise. Die Sprossung der Mutterzellen erfolgt regelmäßig an einem oder an mehreren „Vegetationspunkten", welche meistens an den Polen liegen. Hat eine Zelle einen Keimschlauch, so dient dieser zur Vermehrung; aber eine kräftige Zelle kann außerdem noch einen oder zwei solcher Vegetationspunkte haben. Der Keimschlauch kann

an verschiedenen Stellen der Mutterzelle entspringen, selten aber an deren Enden. Er nimmt verschiedene, oft merkwürdige Formen an (Fig. 3).

In einer Abhandlung über die im Schleimfluß lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen macht Hansen[13]) die Bemerkung, daß Laurent[21]) versucht hat, geltend zu machen, daß alle von Hansen und anderen Forschern beschriebenen roten Sproßpilze der gleichen Spezies angehören. Hansen erklärt jedoch die Anschauung von Laurent für unrichtig, da jene Sproßpilze nicht nur deutliche morphologische Unterschiede zeigen, sonderne auch durch ihr physiologisches Verhalten scharf voneinander getrennt sind. Einige entwickeln sofort Oberflächenvegetationen auf der Nährflüssigkeit, andere nicht; einige scheiden Invertin aus, während anderen dieses Enzyem fehlt; einige verflüssigen die Nährgelatine sehr rasch, während es andere nicht tun. Einige wachsen auf Kleister, andere dagegen nicht. Hansen hebt auch noch das verschiedene Aussehen, welches die verschiedenen Vegetationen der Arten in Nährgelatine und Nährlösungen darbieten können, hervor. „Wir haben hier so deutlich voneinander getrennte Arten, wie wir sie überhaupt bei den Mikroorganismen kennen."

Kurze Mitteilungen über „Rosahefen" kamen später öfter von Koch und seinen Schülern. Ob bei diesen unter dem Namen „Rosahefen" zusammengefaßten Sproßpilzen echte Saccharomyceten sich befanden, oder ob darunter nur Sproßpilze ohne Sporenbildung zu verstehen sind, läßt sich, wie ebenfalls schon Hansen[14]) ausführt, nicht feststellen.

Lindner[23]) hält jedenfalls die Rosahefe von Koch für identisch mit der einen von Hansen[12]) abgebildeten Art, weil sie die gleichen bizarren Aus-

wüchse wie diese zeigt (Fig. 3). Nach Lindners Angaben bildet die Rosahefe von Koch in älteren Kulturen Decken und vermag keine Sporen zu bilden.

Auch Elfvings[6]) rot gefärbter Sproßpilz bildet keine Sporen. Bemerkenswert ist, daß dieser Pilz in einer Lösung von Magnesiumsulfat, Kaliumnitrat und ganz wenig Eisenchlorid in Wasser unter dem Einfluß des Lichtes vegetieren konnte. Es scheint, daß diese Fähigkeit mit dem roten Pigment in Zusammenhang steht.

Kayser[17]) erwähnt eine Rosahefe, von der er aber nichts weiter angibt, als daß sie im trockenen

Fig. 4. Fig. 5.

Fig. 4. Hefenform von rotem *Cladosporium herbarum* Laurent, auf Gelatine gewachsen. Fig. 5 desgl. auf Kartoffelscheiben gewachsen. Vergr. $\frac{600}{1}$.

Zustand einer Temperatur von 45° C und im feuchten Zustand einer solchen von 80° C zu widerstehen vermag, also jedenfalls ein verhältnismäßig hohes Widerstandsvermögen hat.

Laurent fand 1888 auf getrockneten Johannisbeeren eine Rosahefe, die aber nach seinen Untersuchungen nur eine Sproßform von *Cladosporium herbarum* darstellte. Die Farbstoffbildung trat nur am Lichte auf, während die Zellen im Dunkeln weiß blieben. Die Form der Zellen war bei Kulturen auf Gelatine eine mehr längliche, auf Kartoffelscheiben eine rundliche (Fig. 4 u. 5). Auf die weiter angeführte

Ansicht Laurents über die Zugehörigkeit seiner Rosahefe zu bestimmten Pilzformen sei hier nicht näher eingegangen. Daß Laurent auf Grund einer Anschauung, die heute kaum mehr eine Berechtigung haben dürfte, zu der Annahme kam, die Rosahefen gehören alle einer einzigen Spezies an, wurde oben schon erwähnt.

Von Laschè[20]) wurden 1892 Mitteilungen über zwei rote Sproßpilze gemacht, welche er zur Gattung *Mycoderma* stellte. Den einen, welchen er von der Oberfläche von Hopfenblättern isoliert hatte, benannte er *Mycoderma humuli.* Der andere wurde als zufällige, aus der Luft stammende Verunreinigung auf einer Gelatinekultur gefunden. Laschè gab ihm den Namen *Mycoderma rubrum.* Nach neueren umfassenden Untersuchungen von Leberle[22]) gehören diese beiden Sproßpilze nicht zu der Gattung *Mycoderma.* Die morphologischen Eigenschaften weisen vielmehr auf die Torulaceen, jener Gruppe von Sproßpilzen, zu der auch die Formen 1 und 2 der hier behandelten Organismen gehören, hin.

Die Zellen von *Mycoderma humuli* sind oval, wurstförmig, oft sehr unregelmäßig und haben einen Durchmesser von ca. 1—2,5 μ. Die Sprossung vollzieht sich gewöhnlich in der Weise, daß seitlich aus der Zelle sich zunächst ein „Mycelfaden" entwickelt; nachdem dieser eine gewisse Länge erreicht hat, sprossen entweder an der Spitze oder an der Seite Zellen hervor. Zuweilen entwickelt eine Zelle auch mehrere „Mycelfäden" (Fig. 6).

Die Oberflächenvegetationen auf Nährlösungen sind rot gefärbt, und zwar ist die Farbe auf schwach saurer Lösung dunkler als auf schwach alkalischer.

Maltose, Dextrose und Saccharose werden nicht

vergoren. In Bier ist Mycoderma humuli entwicklungsfähig.

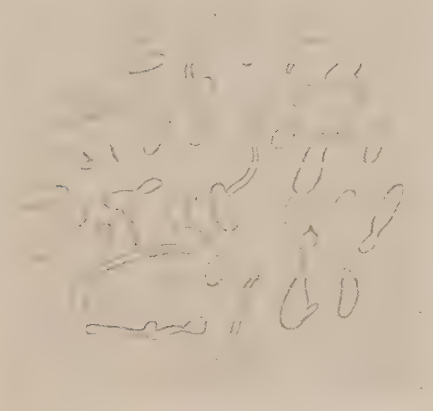


Fig. 6. *Mycoderma humuli* Laschè.

Fig. 7. *Mycoderma rubrum* Laschè.

Mycoderma rubrum (Fig. 7) sproßt in ähnlicher Weise wie *Mycoderma humuli*, jedoch entstehen

Sprosse auch, ohne daß vorher ein „Mycelfaden“ gebildet wird. Die Zellen haben einen Durchmesser von 1,5—3 μ. Auf Würze bilden sie eine sehr dünne, blaßrote Haut; allmählich entwickelt sich jedoch Haut und Ring stärker und die Farbe wird schließlich noch tiefer als bei *Mycoderma humuli*.

Dextrose, Maltose und Saccharose werden auch von dieser Art nicht vergoren, auch Bier wird nicht verändert.

Gelatine wird von beiden Arten verflüssigt und nimmt einen fauligen Geruch an.

Wir kommen nun zu einem Zeitabschnitt, aus dem einige Untersuchungen über rote Sproßpilze vorliegen, welche eine größere Ausführlichkeit als die bisher angeführten aufweisen. Sie gestatten infolgedessen auch weit eher als die älteren Untersuchungen einem Zusammenhang der einzelnen Arten nachzuforschen, bezw. die Identität der einen oder der anderen festzustellen.

Zunächst kommt eine Arbeit von Fischer und Brebeck[8]) in Betracht.

Im Jahre 1894 beschrieben diese beiden Forscher einen roten Sproßpilz, welchen sie, da er im System nicht recht unterzubringen war, „vorläufig“ als *Blastoderma salmonicolor*, wegen der lachsroten Farbe der Kulturen, bezw. der Oberflächenvegetationen, bezeichneten. Der Sproßpilz war im Plankton auf hoher See aufgefunden worden.

Da neben den ovalen, bezw. elliptischen Sproßzellen, welche sich auf Fisch-Seewassergelatine gebildet hatten und die in der Größe den Bierhefenzellen fast gleichkamen, noch außerordentlich lange, zylindrische, bezw. sichelförmige Zellen vorhanden waren, glaubten die beiden genannten Forscher den roten

Sproßpilz nicht als eine Torulaart betrachten zu dürfen.

Wurde der Pilz auf Fisch-Seewassergelatine ausgesät, so entwickelten sich gelbrötliche, schleimige, tropfenartige Kolonien. Gelatine vermochte er langsam zu verflüssigen und bildete auf den verwendeten Nährflüssigkeiten innerhalb weniger Tage eine anfangs grauweiße, dünne, glänzende Oberflächenvegetation, die weiter in eine lachsfarbige, dicke, zähe, stark faltige und an der Oberfläche wie bestäubt aussehende überging. In reinem Nordseewasser erfolgte eine nicht unbeträchtliche Vermehrung des Pilzes, ohne daß es jedoch zur Hautbildung kam. Bei Körpertemperatur zeigte er kein Wachstum mehr.

Wichtig für unsere Vergleichung mit anderen Formen ist folgende Angabe: In den Oberfächenvegetationen fanden sich regelmäßige, ovale bezw. elliptische Sproßzellen mit den gewöhnlichen Sprossen in der Nähe der Polenden. Diese Zellen erschienen teils einzeln, teils zu kleineren Sproßverbänden vereinigt. Im letzteren Falle fanden sie sich meist in Verbindung mit teils birnförmigen, teils halbmond- oder bohnenförmigen Zellen von etwa gleicher Größe oder aber auch mit auffallend langen und schmalen, zylindrischen, sichelförmigen, S-förmig oder unregelmäßig gekrümmten, zuweilen an dem einen Ende keulenförmig verdickten Zellen. Die längeren, schmalen, fadenartigen Verbindungsstücke, die mehrfach zwischen einzelnen Sproßzellen oder zwischen kleinen Sproßverbänden den Zusammenhang vermittelten, sahen, namentlich wenn sie aus mehreren Zellen zusammengesetzt oder gar verästelt waren, wie ein Mycel aus.

Bei der Untersuchung im hängenden Tropfen Bierwürze oder Bierwürzegelatine wurden bald noch eigen-

tümliche, stielartige Ausläufer beobachtet, die birn-, pflaumen- oder nierenförmige Körper trugen und einen eigentümlichen, an Luftblasen erinnernden Reflex erkennen ließen. Der Reflex wurde dadurch bedingt, daß die Stiele und die daran befindlichen Körper aus dem Nährboden heraus in die Luft gewachsen waren.

In Betreff der Entstehung dieser Gebilde ist noch zu bemerken, daß sich meist nahe dem Äquator der Zelle eine ganz dünne Ausstülpung bildete, aus welcher schließlich ein nahezu rechtwinklig zur Längsachse der Zelle ausgehender, dünner Stiel hervorging, der schließlich ähnlich wie eine gewöhnliche Sproßzelle durch eine Querwand von der Mutterzelle abgetrennt wurde und an dessen entgegengesetztem Ende sich ebenfalls eine Zelle abschnürte. Aus dieser ging gewöhnlich der meist pflaumenähnliche Körper hervor. Die stielartigen Auswüchse fanden sich nicht nur bei den kürzeren ovalen, bezw. elliptischen Zellen, sondern auch bei den längeren, sichel- bezw. keulenförmigen oder sonstwie geformten Zellen vor. Die Verfasser halten diese Gebilde für Konidien und stützen ihre Anschauung darauf, daß in der Nähe von oberflächlich gelegenen Kolonien und dem Belag von Strichkulturen sekundäre Kolonien entstanden waren, und zwar in der Weise, daß die pflaumenförmigen Gebilde von den Kolonien abfielen und sich in der Nähe festsetzten.

In Schälchenkulturen gehen die anfangs glatten, tropfenartigen, gelblichroten, an der Oberfläche gelegenen Kolonien schließlich in mehr oder minder große rundliche Auflagerungen über, die ringsum von kleinen, jungen, unregelmäßig zerstreuten, punktgroßen sekundären Kolonien umgeben sind. Mit Beginn der zweiten Woche macht sich gewöhnlich Verflüssigung der Gelatine bemerkbar. Die tiefer gelegenen

Kolonien sind anfangs kugelig, gelbrötlich, später erscheinen sie mehr eckig bezw. zackig.

An den Strichkulturen auf Bierwürzegelatine kommt es bald zu einer dicken und breiten, lachsroten Auflagerung, deren Oberfläche eine starke, gekröseartige Fältelung annimmt und schließlich trocken und wie bestäubt erscheint. Der Rand der Auflagerung sieht infolge der zahlreichen sekundären Kolonien wie zersprengt aus. Auch auf Kartoffelscheiben entsteht eine dicke, runzlig-faltige, etwas durchscheinende, blaßrosafarbige Auflagerung.

Weder in Bierwürze noch in verschiedenen Zuckerlösungen kam es zu einer Vergärung des Zuckers.

In den Vacuolen war ein tanzendes Körperchen meist nicht wahrzunehmen. Bei älteren Zellen tritt oft ein rötlicher Farbenton an den Vacuolen deutlich hervor.

Aus dieser Beschreibung ist ersichtlich, daß *Blastoderma salmonicolor*, der einen Form (3) von Hansen nahesteht. Ferner ist es in mancher Beziehung dem *Mycoderma humuli* und *rubrum* von Laschè und der noch zu besprechenden roten Torula Nr. 36 von Janssens und Mertens ähnlich sowie der Form 3 der in vorliegender Arbeit beschriebenen Arten.

Janssens und Mertens[16]) veröffentlichten im Jahre 1903 eingehende Studien über einen, von ihnen als Torula Nr. 36 bezeichneten, roten Sproßpilz. Dieser Pilz war aus dem Absatz eines Flaschenbieres aus Maidstone (England) isoliert worden. Seine Zellen gleichen in ihrer Form sehr den gewöhnlichen Hefenzellen. Sie sind kleiner wie die von Hansen beschriebene Pastorianusform. Schon in sehr jungen Häuten neigen sie zur Bildung relativ langer Fäden

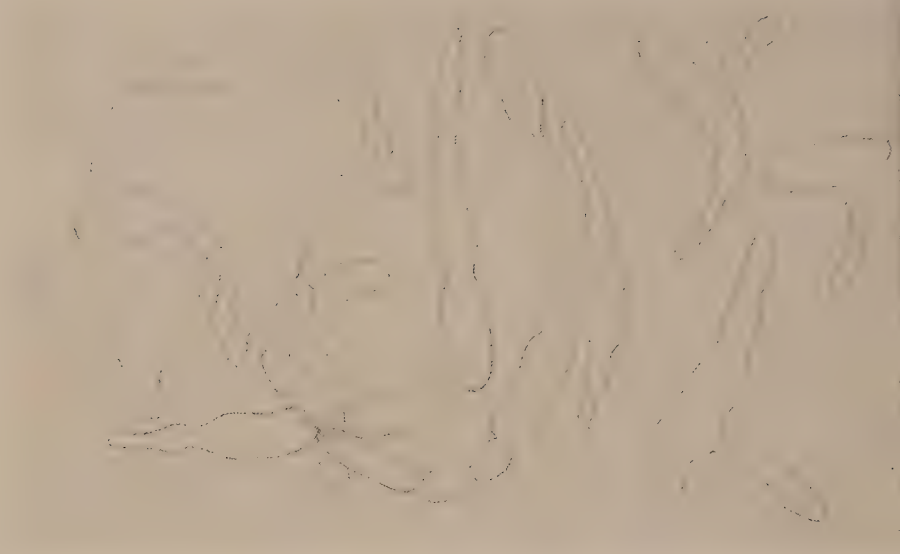


Fig. 8.

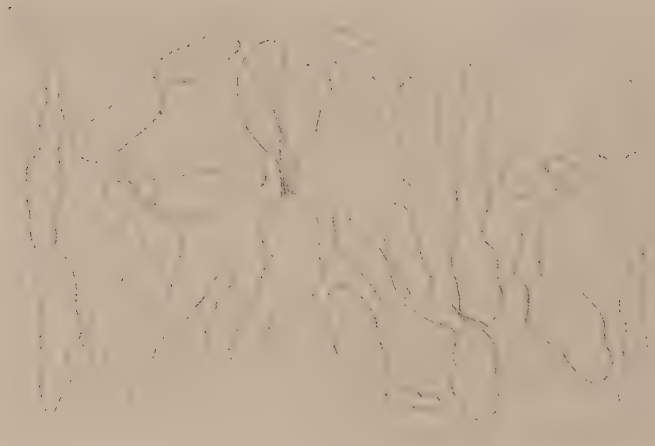


Fig. 9.
Torula Nr. 36 Janssens u. Mertens. Junge Oberflächenvegetation.
Vergr. $\frac{1500}{1}$.

(Fig. 8 u. 9). Die Sprosse bilden sich sowohl an den Polen der Mutterzelle, als auch an der Seite oder in der Mitte. Charakteristisch für die Sprossung dieser roten Torula ist, daß eine große Zahl von Tochterzellen beinahe an derselben Stelle der Mutterzelle (Fig. 8 unten) entstehen. Diese Erscheinung erinnert an die als „Kronenbildung“ bezeichnete Sproßform, welche bei Sproßpilzen überhaupt, besonders aber bei den Torulaceen häufig zu beobachten ist. Allerdings

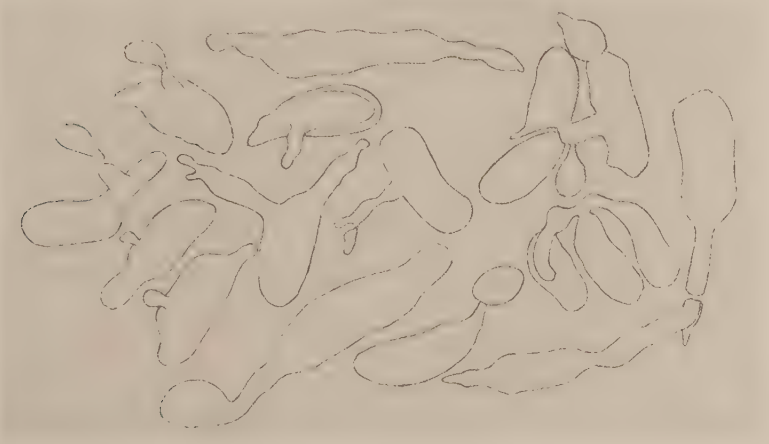


Fig. 10. Torula Nr. 36 Janssens u. Mertens. Junger Ring. Vergr. $\frac{1500}{1}$.

besitzen bei der roten Torula von Janssens und Mertens die Tochterzellen nicht immer eine regelmäßige Form, wie dies sonst meistens der Fall ist. Diese Art der Sprossung tritt bei der roten Torula Nr. 36 am häufigsten in alten Oberflächenvegetationen und am Licht auf. Eine weitere, sowohl in alten Häuten, als im Ring auftretende Sprossungsform ist die Bildung von verhältnismäßig langen „Promycelien“, die teilweise Keimschläuchen gleichen. Solche Zel-

Fig. 11.

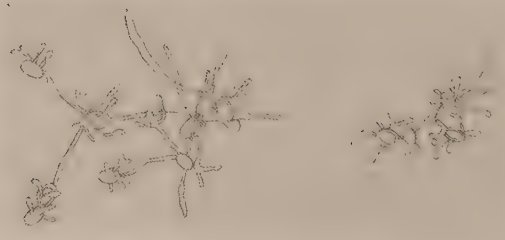


Fig. 12.

Torula Nr. 36 Janssens u. Mertens. Fig. 11. 6 Monate alte, im Dunkeln gewachsene Haut. Fig. 12. 6 Monate alte, am Licht gewachsene Haut. Vergr. $\frac{500}{1}$.

len haben eine gewisse Aehnlichkeit mit Konidien. Sie entstehen am häufigsten an seitlichen Sprossen (Fig. 10). Die Verfasser halten diese Zellen für nichts anderes als gewöhnliche Sprosse, denn es finden sich alle Uebergänge zwischen solchen und den „gestielten Sprossen". Wenn also der Ausdruck „Konidien" gebraucht wird, so sollen damit nicht besondere Fortpflanzungszellen gemeint sein.

Durch das Licht wird die rote Torula Nr. 36 beeinflußt, und zwar hauptsächlich in den Hautzellen. Diese werden im Dunkeln viel größer als am Licht, und die Haut selbst ist stärker gefärbt und weniger derb. Am Licht sieht die Oberflächenvegetation aus wie ein flaumiger Filz. Viele der Fäden erheben sich über die Oberfläche der Flüssigkeit.

Im Ring sind die Zellen am intensivsten gefärbt. Sie sind erfüllt von stark lichtbrechenden Körperchen, welche wie Oelkügelchen aussehen und orange gefärbt sind. Diese Zellen sind oft in der Mitte eingeschnürt, und zwar ebenso wenn eine große Zahl von Granula vorhanden ist, wie wenn sie nur zwei größere Kügelchen enthalten. Die Einschnürung kann manchmal fast bis zur Trennung der beiden Teile gehen. Die vollständige Trennung wurde jedoch niemals beobachtet.

Die Zellen aus jungen Absätzen ähneln sehr den ellipsoidischen Hefen. In älteren Absätzen sind die Zellen weniger gefärbt, schwach braun und weniger glänzend.

Die Hautbildung auf Bierwürze geht rasch vor sich. Durch die Gegenwart von Ammonkarbonat wird sie verhindert.

Auf Würzegelatine bilden sich Kolonien, die in der Mitte etwas eingesenkt sind und deren periphere Zellen den rund um einen kreisförmigen Wulst lie-

genden Rand wie ausgefranst erscheinen lassen. Die Oberfläche sieht wie bestäubt aus (Tafel II, Fig. 12). Die Gelatine wird langsam verflüssigt.

Besonders charakteristisch ist bei der roten Torula Nr. 36, daß ähnlich wie bei *Blastoderma salmonicolor* Fischer und Brebeck, sekundäre Kolonien auf Plattenkulturen usw. gebildet werden. Während jedoch bei *Blastoderma salmonicolor* die „Konidien" einfach abfallen, werden sie nach den Angaben von Janssens und Mertens bei ihrer roten Torula

Fig. 13.

Fig. 14.

Torula Nr. 36 Janssens u. Mertens. Fig. 13 alte, Fig. 14 junge Gelatinekulturen. Vergr. $\frac{500}{1}$.

durch Gasentwicklung innerhalb der Kolonie aus dieser herausgeschleudert. Wenn man die Kulturen in Petrischalen mit dem Deckel nach unten hinlegt, so wird auf dem Deckel ein „Spiegelbild" der Kolonie erzeugt, welches auffallenderweise nicht gefärbt ist. Diese Spiegelbilder bestehen aus kleinen Gruppen von ziemlich regelmäßigen Zellen, die aber häufig an einem Ende unvermittelt dünner werden, also Formen zeigen, wie sie bei *Blastoderma salmonicolor* und bei der später zu beschreibenden Form 3 auftreten (Tafel II Fig. 11).

Alkoholische Gärung ruft die rote Torula Nr. 36 nicht hervor.

Das Optimum der Entwicklung liegt zwischen 20°

und 25° C, bei 30° wird die Lebensfähigkeit schon herabgemindert.
Der rote Farbstoff ist Karotin.

* * *

Die vier rot gefärbten Organismen, welche den Gegenstand der vorliegenden Untersuchung bilden, wurden mir in liebenswürdigster Weise von Herrn Prof. Dr. H. Will, Abteilungsvorsteher an der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München, überlassen. Sie sind mit dem Nummern 1—4 bezeichnet.

Nr. 1 wurde in der Wasserreserve einer Brauerei gefunden; es ist der Sproßpilz, welcher die früher schon erwähnte Rotfärbung eines Grünmalzes verursachte.

Nr. 2 ist aus einem pasteurisierten Bremer Bier isoliert worden.

Nr. 3 fand sich als zufällige Verunreinigung auf einer Gelatinekultur ein.

Nr. 4 stammt aus einem Brauwasser.

Von allen 4 Formen wurden Reinzuchten aus einer Zelle nach der Tröpfchenmethode von P. Lindner[24]) unter Verwendung von gehopfter Bierwürze angefertigt. Die Reinzucht auf Gelatine, welche zuerst versucht wurde, bot insofern Schwierigkeiten, als die Zellen wegen ihres geringen Lichtbrechungsvermögens in der Gelatine kaum aufzufinden sind. Außerdem tritt sehr bald Verflüssigung ein.

Von den Reinzuchten wurden zunächst Abimpfungen in Bierwürze gemacht.

Bei der Untersuchung wurden folgende Nährlösungen verwendet:

1. gehopfte Bierwürze von 11—12° B, sterilisiert durch halbstündiges Erhitzen in strömendem Dampf;

2. neutrales Hefenwasser nach der Vorschrift von Will[38]);
3. Hefenwasser mit einem Zusatz von 8% Zucker. Es kamen zur Anwendung: Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose und Milchzucker;
4. Heudekokt, erhalten durch viertelstündiges Kochen von etwa 10 g Heu mit 1 l Wasser. Der filtrierte Absud wurde in Reagenzgläser verteilt (je 10 ccm), diese mit Watte verschlossen und dann an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 20 Minuten lang im Autoklaven unter Druck erhitzt[26]);
5. Milch, entrahmt, zu je 10 ccm auf Reagenzgläser gefüllt und wie Heudekokt sterilisiert;
6. Lösung nach Elfving[6]), bestehend aus 1 g Magnesiumsulfat, 1 g Kaliumnitrat und einer ganz geringen Menge Eisenchlorid auf 100 ccm Wasser;
7. Seewasser (aus dem Adriatischen Meer);
8. Peptonlösung mit Zusatz von Alkohol und von verschiedenen organischen Säuren. Die Peptonlösung hatte folgende Zusammensetzung:

20,0 g Pepton Witte		
2,1 g $MgSO_4$		auf 1 Liter
4,55 g KH_2PO_4		destilliertes Wasser.
0,5 g $CaHPO_4$		

An festen Nährböden gelangten zur Anwendung:
1. 10prozentige gehopfte Würzegelatine, hergestellt nach den Angaben von Klöcker[18]);
2. 10prozentige Kartoffelwassergelatine[39]);
3. 10prozentige Rübenwassergelatine[39]);
4. Kartoffeln. Rohe Kartoffeln wurden in etwa 4 cm lange, keilförmige Stückchen geschnitten, diese einen Tag lang in 2prozentige Sodalösung gelegt, dann in Reagenzröhrchen gegeben und

nach dem Aufsetzen eines Wattebausches wie Heudekokt sterilisiert. Die Reagenzröhrchen waren etwa 4 cm vom unteren Ende entfernt mit zwei Einbuchtungen versehen, um das Hineinfallen der Kartoffelstückchen in das im unteren Teil des Rohres sich ansammelnde Kondenswasser zu verhindern[27]).

Als Kulturgefäße dienten für Nährlösungen Freudenreichkölbchen, Pasteurkölbchen, Erlenmeyerkölbchen und Reagenzgläser; für feste Nährböden Erlenmeyerkölbchen und Reagenzgläser sowie Petrischalen.

A. Allgemeine Morphologie.

Nach der zur Zeit geltenden Auffassung werden die bis jetzt ausführlicher beschriebenen roten Sproßpilze ohne Sporenbildung, mit kugelförmigen, ellipsoidischen und gestreckt ellipsoidischen Zellen zu den Torulaceen gestellt.

Die bis jetzt bekannt gewordenen Eigenschaften der Torulaceen und, im Anschluß daran, der roten Sproßpilze hat H. Will im Handbuch der technischen Mykologie[43]) zusammengefaßt.

Sproßpilze ohne Sporenbildung, welche zu den Torulaceen gerechnet werden, zeigen folgende charakteristische Merkmale. Die Form der Zellen ist meist eine gedrungene, mehr oder weniger kugelförmige. Aber auch gestreckt ellipsoidische, ja selbst lange, fadenförmige Zellen kommen vor. Auch apiculatusähnliche Formen sind nicht selten. Die Größe der Zellen ist außerordentlich verschieden. Eine bei den Torulaceen auftretende und daher sehr charakteristische Erscheinung ist die Bildung von Riesenzellen. Der Zellinhalt erscheint, da er nur ein geringes Lichtbrechungsvermögen besitzt, sehr blaß. Ein weiteres

sehr charakteristisches Merkmal der Torulaceen sind die stark lichtbrechenden Körperchen, welche in der Ein- oder Mehrzahl im Plasma eingelagert sind. Da die Oeltröpfchen bei vielen Formen mit größter Regelmäßigkeit und stets in gleicher Anzahl auftreten, werden sie, wie Will hervorhebt, bei Aufstellung eines Systems als diagnostisches Merkmal für die betreffenden Formen herangezogen werden können. Das gleiche gilt von den krystallähnlichen Einschlüssen, welche sich häufig in den Vakuolen vorfinden.

Die Sprossung vollzieht sich bei den Torulaceen meist ganz ähnlich wie bei den Saccharomyceten. Nur bei den mehr kugelförmigen Zellen zeigt sich als Eigentümlichkeit häufig die sogenannte „Kronenbildung", d. i. gleichzeitiges Hervortreten mehrerer Tochterzellen an einer eng umgrenzten Stelle der Mutterzelle.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß Will, um wenigstens vorläufig eine Uebersicht über die bis dahin wenig erforschte Gruppe der Sproßpilze ohne Sporenbildung zu erhalten, die Torulaceen in zwei Untergruppen teilte. Die erste umfaßt alle Arten mit ausschließlich gedrungenen Zellformen. Größere Sproßverbände kommen nicht vor. Gärvermögen fehlt oder tritt nur in geringem Grade auf. In der zweiten Untergruppe sind diejenigen Arten vereinigt, welche neben den gedrungenen Zellformen langgestreckte, wurstförmige besitzen, die zu weitverzweigten Sproßverbänden vereinigt sind. Von den Mycodermaarten unterscheiden sie sich durch ihr Gärvermögen, von den Monilien durch den Mangel eines Mycels mit Querwänden.

Bei keiner der vier in vorliegender Arbeit beschriebenen Formen konnte jemals Sporenbildung beobachtet werden.

Die Formen 1 und 2 besitzen genau die oben als charakteristisch für die Torulaceen angegebene Gestalt und Größe der Zellen. Bei den Formen 3 und 4 zeigen sich dagegen wesentliche Abweichungen.

Die Zellen der Formen 1 und 2 sind ellipsoidisch bis gestreckt ellipsoidisch. Bei 1 finden wir fast immer zwei stark lichtbrechende Körperchen, bei 2 in jüngeren Kulturen meistens keine, in älteren eines bis viele. Krystallähnliche Einschlüsse in den Vacuolen wurden nur bei 1 gefunden. Bei dieser Form findet eine starke Verschleimung der Zellhaut statt und infolgedessen wird der Bodensatz in den Kulturen fadenziehend. Riesenzellen kommen sowohl bei der Form 1. als auch bei 2 vor.

Die Sprossung erfolgt bei 1 und 2 fast immer an den Polen. Auch Kronenbildung wurde beobachtet. Größere Sproßverbände (mehr als 4—5 Zellen) gibt es bei diesen Formen nicht.

Die Zellen der Form 3 sind sehr unregelmäßig. Wir finden lange, fadenförmige Zellen, die durch keimschlauchartige Auswüchse die mannigfaltigsten Formen erhalten. Stark lichtbrechende Körperchen treten meistens erst in älteren Kulturen auf. Die Sprossung geht in der Weise vor sich, daß die gestreckt ellipsoidischen Zellen entweder wieder solche Zellen hervorbringen oder aber ein unregelmäßiges, gewundenes, keimschlauchartiges Gebilde austreiben, an dessen Ende später eine eigentümliche, meist nierenförmige Anschwellung entsteht, welche sich bald abschnürt und abfällt.

Bei der Form 4 finden wir lange, sehr dünne Zellfäden und kurze, gestreckt ellipsoidische Zellen. In diesen sind häufig zwei stark lichtbrechende Körperchen enthalten. In älteren Kulturen sind solche meistens sehr zahlreich und unregelmäßig in den Zellen

verteilt. Aus den ellipsoidischen Zellen sproßt eine Tochterzelle, die allmählich zu einem langen, stark verzweigten Faden auswächst, in welchem auch ab und zu Querwände auftreten. An den Enden dieser Fäden werden dann wieder gestreckt ellipsoidische Zellen hervorgebracht, welche sich abtrennen, sobald sie eine gewisse Größe erreicht haben.

B. Spezielle Morphologie.

Form 1.

Die Gestalt der Zellen ist in gehopfter Würze sehr gleichmäßig ellipsoidisch bis gestreckt ellipsoidisch. Ihre Größe beträgt 7—8 μ : 4 μ (Fig. 15—19). Nur bei sehr niederen Temperaturen zeigen sich Unregelmäßigkeiten. Bei 0—2° C wurden nämlich lange, fadenförmige, unregelmäßig geformte Zellen beobachtet (Fig. 20), eine Erscheinung, die nicht weiter auffällig ist, da sie auch bei den Saccharomyceten vorkommt. Unter normalen Verhältnissen sind die gestreckt ellipsodischen Zellen vorherrschend. Sie haben eine gewisse Ähnlichkeit mit den Arten der Gattungen *Mycoderma* und *Willia*, unterscheiden sich aber besonders von *Mycoderma* dadurch, daß die Pole abgerundet und nicht abgeplattet wie bei jenen sind. Die Zellform wird im Gegensatz zu anderen, ähnlichen Organismen, bei welchen in älteren Kulturen öfters sehr langgestreckte Zellen auftreten, im Lauf der Entwicklung der Kulturen nicht geändert. In Würze fehlen Riesenzellen in der Regel. Nur in einer 4 Jahre alten Würzekultur wurden sie in großer Menge gefunden. In Würzegelatine- und in Kartoffelkulturen sowie in neutralem Hefenwasser traten sie dagegen stets auf. Besonders zahlreich waren sie in der letztgenannten Nährlösung, in der sie sich dadurch aus-

Fig. 15.

Fig. 16.

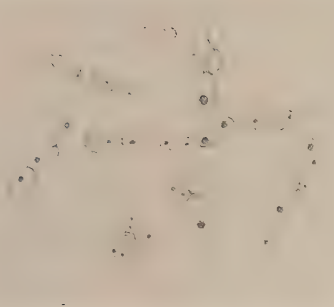


Fig. 17.

Fig 18.

Fig. 19.

Form r. Fig. 15. 7 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 7—10° gewachsen; Ring. — Fig. 16. 2 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen; Ring. — Fig. 17. 41 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen; Haut. — Fig. 18. 13 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen; Bodensatz. — Fig. 19. 4 Tage alte Kultur auf Würzegelatine bei 25° gewachsen, Randzone. — Vergr. $\frac{635}{1}$.

Fig. 20. *Form 1.* 40 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 0—2° gewachsen; Absatz. Vergr. $\frac{635}{1}$.

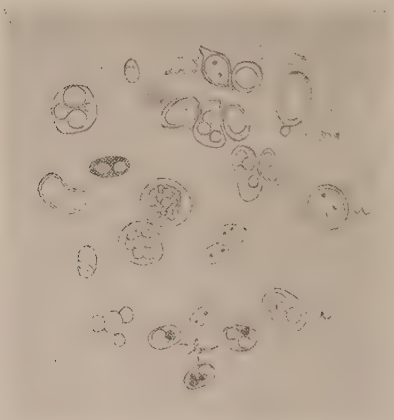


Fig. 21. *Form 1.* 13 Tage alte Strichkultur auf Kartoffel bei 25° gewachsen; in den mit a bezeichneten Zellen Tanzkörperchen, in den mit b bezeichneten unregelmässig geformte, kantige Fettkörperchen. Vergr. $\frac{635}{1}$.

zeichneten, daß sie fast keine stark lichtbrechenden Körperchen enthielten und sehr dicke Häute besaßen, und in den Kartoffelkulturen anzutreffen. In diesen waren es besondere Stellen — warzenförmige Erhebungen des Oberflächenbelages — wo sie in großer Menge vorkamen. Sie sind meistens fast kugelförmig und haben einen Durchmesser von 11—13 μ (Fig. 21).

In Strichkulturen auf Kartoffeln waren die Zellen in der Hauptsache regelmäßig, aber nicht gestreckt ellipsoidisch, sondern mehr rundlich. Ihre Größe be-

Fig. 22. *Form 1.* 4 Tage alte Strichkultur auf Kartoffel bei 25° gewachsen. Vergr. $\frac{635}{1}$.

trug 8:5,4μ. Daneben kamen aber auch sehr viele kleine Zellen von der gewöhnlichen Form und der Größe 4,4:3,3 μ vor. Am oberen Teil des Impfstriches auf Kartoffeln waren die Zellen unregelmäßig geformt, häufig an beiden Enden wie die Apiculatusarten zugespitzt oder leicht gekrümmt. Größe: 6,6 zu 4,4 μ (Fig. 22). Ob nun diese Variation der Form durch die dichte Aneinanderlagerung der Zellen, oder ob sie durch das Nährsubstrat verursacht war, bleibt unentschieden. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß auf Würzegelatine, wo die Zellen auch sehr dicht beisammenliegen, nie derartige Formveränderungen vor-

kommen. Sohin ist es sehr wahrscheinlich, daß die beschriebene Zellform durch die Art des Substrates bedingt war.

Die scharf abgegrenzte Zellhaut zeigt in verschiedenen Kulturen eine verschiedene Dicke. In den Oberflächenvegetationen erscheint sie bei einzelnen Zellen sehr dick und ist dann verschleimt. Die Verschleimung geht so weit, daß in älteren Kulturen die ganze Oberflächenvegetation fadenziehend wird. In neutralem Hefenwasser trat dagegen eine Verschleimung der Zellmembran nicht ein. Auf die fehlende oder in verschiedenem Grade ausgebildete Verschleimung ist wahrscheinlich auch die Erscheinung zurückzuführen, daß die Zellen von Kulturen, die auf verschiedenen Substraten gewachsen sind, sich in Wasser leichter oder schwerer verteilen lassen.

Der Zellinhalt ist bei den Zellen verschiedensten Alters ungemein schwach lichtbrechend, ähnlich wie bei den meisten Torulaceen und Mycodermaarten. Das Lichtbrechungsvermögen ist so gering, daß in Gelatine die einzelnen Zellen nur sehr schwer aufzufinden sind. Besonders blaß waren die Zellen aus dem Absatz einer Kultur in neutralem Hefenwasser.

In den jüngeren Zellen sind wie gewöhnlich Vacuolen nicht sichtbar. Später wird der Inhalt wie bei den Arten der ersten Untergruppe der Torulaceen[45]) schaumig, dann treten größere Vacuolen in verschiedener Zahl und verschiedenem Umfang auf. Eine Regelmäßigkeit in der Zahl und Lagerung der Vacuolen, wie sie bei den Arten der Gattung *Mycoderma* vorhanden zu sein pflegt, kommt hier nicht vor. In älteren Zellen füllen die Vacuolen infolge sehr weitgehender Reduktion des Protoplasmas deren Inneres nahezu aus. Der Vacuoleninhalt erscheint gegenüber dem übrigen Zellinhalt matt, die Vacuolen

treten nicht scharf hervor. Der Unterschied im Lichtbrechungsvermögen zwischen Protoplasma und Vacuoleninhalt ist also gering. Die Zahl und Größe der Vacuolen wechselt nach dem Substrat, auf dem die Zellen gewachsen sind. Besonders in 4 Tage alten Kartoffelkulturen waren sie sehr groß oder es waren sehr viele kleine vorhanden. Granula — sog. Tanzkörperchen — treten in den Vacuolen in der Regel nicht auf; sind sie aber vorhanden, dann besitzen sie Stäbchenform (Kristalle), Fig. 21.

Ein sehr charakteristischer Bestandteil des Plasmas sind die stark lichtbrechenden Körperchen — entweder Fettkügelchen oder Oeltröpfchen —, die meist in der Zweizahl, seltener in größerer Anzahl vorhanden sind. Bei Gegenwart von drei Fetttröpfchen haben meist zwei die gleiche Größe, während das dritte größer oder kleiner ist. In der Mehrzahl der Fälle erscheinen die stark lichtbrechenden Körperchen an den beiden Polen der Zelle gelagert. In dieser Hinsicht ist dann das mikroskopische Bild dem der Willia- und Mycodermaarten sehr ähnlich. In jungen Kulturen sind, solange der Zellinhalt schaumig ist, keine Granula sichtbar; sie treten erst in älteren Zellen hervor. Anfangs farblos, erscheinen sie in alten Kulturen gelb gefärbt. In solchen häufen sich die Granulationen und fließen später zu öligen Tropfen zusammen, wobei sie die Zelle fast vollständig ausfüllen. Bei einem Druck auf das Deckglas treten die Tropfen aus den Zellen aus und vereinigen sich, im Wasser herumschwimmend, zu großen Kugeln. Die Außenseite der Zellen älterer Kulturen bedecken oft dicht aneinander liegende, kleinere, stark lichtbrechende Tröpfchen. Zwischen den Zellen schwimmen große, gelb gefärbte, ölige Kugeln, die 4—5 mal so groß wie die Zellen sind, umher. Daraus geht hervor, daß die

stark lichtbrechende Substanz von selbst aus den Zellen, ohne Verletzung der Zellhaut, austreten kann.

Die in den älteren Zellen auftretenden, stark lichtbrechenden Körperchen sind die Träger des roten Farbstoffes. Ob die in jüngeren Zellen regelmäßig angeordneten farblosen, stark lichtbrechenden Körperchen später ebenfalls den Farbstoff enthalten, läßt sich nicht entscheiden.

Die Konsistenz der öligen Substanz scheint mit den verschiedenen Nährböden zu wechseln. So wurde z. B. beobachtet, daß sie in Zellen, die auf Kartoffeln gewachsen waren, nicht Tropfenform besaßen, sondern unregelmäßig, eckig begrenzt waren, also eine größere Dichte hatten (Fig. 21).

Auf Ueberosmiumsäure reagieren die Tröpfchen sowohl innerhalb, als auch außerhalb der Zelle mit Dunkelgelb- bis Gelbbraunfärbung. Die Stärke der Reaktion war nach dem Alter der Kulturen und dem Nährboden, auf oder in dem die Zellen gewachsen waren, verschieden. Nach ihrem Verhalten gegenüber dem genannten Reagens ist die stark lichtbrechende Substanz in der Hauptsache wahrscheinlich fettartiger Natur. Jedenfalls ist es aber eine ungesättigte Verbindung[28]).

Bei Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure auf die stark lichtbrechenden Körperchen färben sich diese nicht wie die Oeltröpfchen der Hautzellen der Saccharomyceten grünlich und später schwarzbraun, sondern sie werden rasch zerstört.

Trocknet man die Zellen und extrahiert man dann die mit Quarzsand oder Glaspulver zerriebene Masse mit Petroläther, so erhält man eine gelbrot gefärbte Lösung. Ist die trockene Masse aber längere Zeit an der Luft gestanden, so erhält man nur einen schwach gelb gefärbten Extrakt. Aus dem roten Petroläther-

extrakt scheiden sich beim Eindunsten gelbe, mikroskopisch kleine Kristalle ab. Läßt man den Extrakt auf dem Objektträger verdunsten und gibt man dann unter das Deckglas konzentrierte Schwefelsäure zu, so tritt an der Berührungsstelle der zurückgebliebenen Substanz mit der Schwefelsäure eine indigoblaue Färbung auf, die nach längerer Einwirkung über violett in Dunkelgelb übergeht: Lipocyanreaktion[47]).

Glykogen konnte in jungen Zellen, hauptsächlich in solchen von Kulturen auf Kartoffeln nachgewiesen werden (Rotbraunfärbung mit Jod-Jodkaliumlösung).

Form 2.

Die Form 2 hat in morphologischer Beziehung manche Ähnlichkeit mit der Form 1, jedoch machen sich auch Verschiedenheiten geltend, so daß eine scharfe Unterscheidung schon nach dem mikroskopischen Bild möglich ist. Zunächst sind die Zellen im allgemeinen gedrungener als bei 1. Die Größe der in Würze herangewachsenen Zellen schwankt zwischen 6:4 μ und 7:4,5 μ gegenüber 7—8:4 μ bei der Form 1. Die Zellen in älteren Kulturen sind durchschnittlich größer als die in jüngeren. Die vorherrschende Zellform ist die ellipsoidische. In älteren Würzekulturen stellen sich häufig auch gestreckt ellipsoidische Zellen ein (Fig. 23, 24 u. 25). Riesenzellen treten vereinzelt in Würzekulturen auf; häufiger finden sie sich in Kulturen auf Kartoffeln und in sehr alten Würzekulturen (3 Jahre) sowie in neutralem Hefenwasser vor. In den Kartoffelkulturen sind neben den Riesenzellen kleine, nahezu kugelförmige Zellen von der Größe 6:5 μ vorhanden (Fig. 26).

Veränderungen der Zellform wurden in sehr alten Kulturen beobachtet sowie bei einer Temperatur von

Fig. 23.

Fig. 24.

Fig. 25.

Form 2. Fig. 23. 2 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen Ring. — Fig. 24. 3 Tage alte Kultur auf Würzegelatine bei 18° gewachsen; Randzone. — Fig. 25. 41 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen Haut. Vergr. $\frac{635}{1}$.

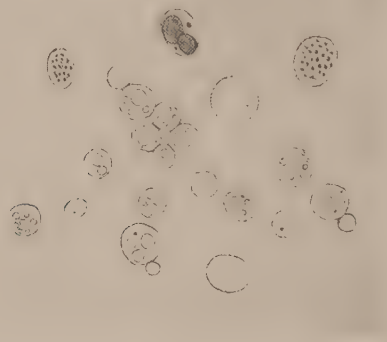


Fig. 26. *Form 2.* 13 Tage alte Strichkultur auf Kartoffel bei 25° gewachsen Vergr. $\frac{635}{1}$.

0—2°. Unter derartig ungünstigen Ernährungsbedingungen bildeten sich wurstförmige, lange Zellen (bis zu 35 μ Länge und 2—3 μ Dicke).

Die Zellhaut, welche sich scharf abhebt, verschleimt nicht, wie das bei 1 der Fall ist, jedoch haften die Zellen in den Belägen auf festen Nährböden, wie beispielsweise auf Kartoffeln, sehr fest aneinander und lasssen sich nur sehr schwer in Wasser verteilen.

Der Zellinhalt ist sehr blaß; Vacuolisierung tritt überhaupt nicht oder nur sehr undeutlich hervor. In Zellen aus Kulturen von festen Nährböden treten dagegen Vacuolen regelmäßig auf, wenngleich auch hier Zellen vorkommen, deren Inhalt keinerlei Differenzierung erkennen läßt. In jüngeren Zellen ist das Plasma schaumig (Fig. 24). Stark lichtbrechende Körperchen sind schon in zwei Tage alten Würzekulturen sichtbar. Meist sind es zwei, die aber im Gegensatz zu Form 1 nicht regelmäßig an den Polen, sondern an verschiedenen Stellen, zuweilen dicht nebeneinander liegen (Fig. 25). Auch Zellen mit nur einem stark lichtbrechenden Körperchen werden nicht selten gefunden. Sind mehr als zwei stark lichtbrechende Körperchen in einer Zelle enthalten, so ist ihre Größe, wie das auch bei der Form 1 der Fall ist, verschieden. Häufig sind dann auch zwei gleich groß, während das dritte größer oder kleiner als jene beiden ist. In älteren Kulturen besitzt die Mehrzahl der Zellen drei stark lichtbrechende Körperchen, jedoch kommen auch viele Zellen vor, die eine sehr große Anzahl enthalten, welche aber dann sehr klein sind. Ungewöhnlich klein waren die stark lichtbrechenden Körperchen in den Zellen einer Kultur in neutralem Hefenwasser. In der zentralen Partie von Riesenkolonien, welche auf Würzegelatine gewachsen

waren, hatten fast alle Zellen ein bis viele stark lichtbrechende Körperchen, die häufig eckige Form besaßen und eine gewisse Aehnlichkeit mit Kristallen hatten. Sie stimmen also in dieser Beziehung mit den auf Kartoffeln gewachsenen Zellen der Form 1 überein. Im Gegensatz zu dieser bleiben aber die stark lichtbrechenden Körperchen auch in älteren Kulturen, sei es auf flüssigen oder festen Nährböden, verhältnismäßig klein.

Fig. 27. *Form 3.* 1 Tag alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen. Hautinselchen. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Hinsichtlich der stark lichtbrechenden Körperchen besteht also ein scharfer Unterschied zwischen den Formen 1 und 2. Bei dieser ist ihre Größe und Zahl in der Regel viel geringer als bei der Form 1. Allerdings finden sich auch bei der Form 2, so z. B. in Kartoffelkulturen, Zellen mit größeren, ja sehr großen stark lichtbrechenden Tropfen (Fig. 26); das sind jedoch nur Ausnahmen und vielleicht schon Alterserscheinungen. Ein wesentlicher Unterschied der beiden Formen besteht darin, daß die stark lichtbre-

chende Substanz sich bei der 2. Form nie außerhalb der Zellen vorfindet und diese auch nicht mit Tröpf-

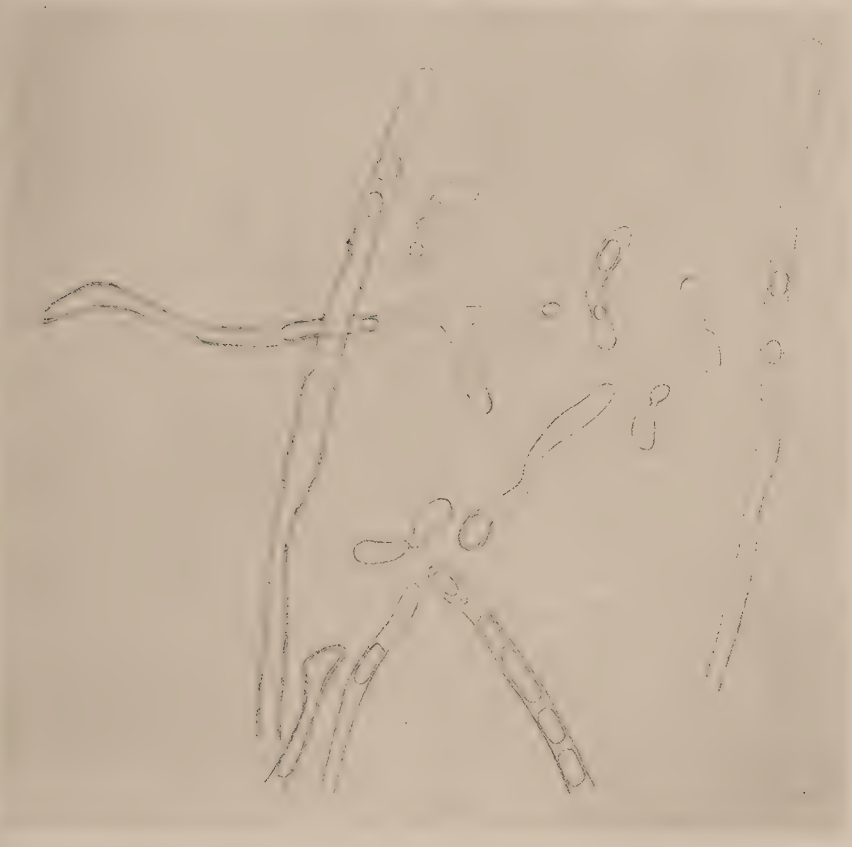


Fig. 28. *Form 3.* 2 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen; Haut. Vergr. $\frac{635}{1}$.

chen der stark lichtbrechenden Substanz an der Außenseite besetzt sind.

Auf Ueberosmiumsäure reagieren die stark lichtbrechenden Körperchen der Form 2, jedoch ist bei der

geringen Größe der Tröpfchen die Reaktion nur schwer zu erkennen. Gegen Schwefelsäure verhalten sie sich wie die der Form 1.

Der eingedampfte Petrolätherextrakt aus den Zellen, welcher rot gefärbt ist, gibt mit konzentrierter Schwefelsäure die Lipocyanreaktion.

Glykogenreaktion wurde in keinem Fall, weder in

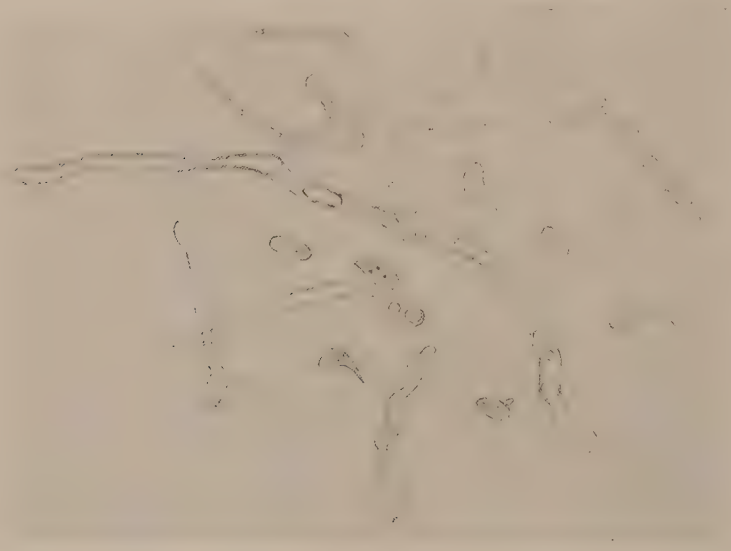


Fig. 29. *Form 3.* 2 Tage alte Kultur auf Würzegelatine bei 18° gewachsen; Randzone. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Kulturen in Flüssigkeiten, noch in solchen auf festen Nährböden beobachtet.

Form 3.

In sehr jungen, etwa 24 Stunden alten Kulturen, sind je nach dem Aussaatmaterial meist nur regelmäßig geformte, gestreckt ellipsoidische Zellen vorhanden (Fig. 27 u. 39). Aber schon in 2 Tage alten

Fig. 30. *Form 3.* 42 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen; Haut. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Kulturen treten sehr verschiedenartige Zellen auf. Sie lassen sich in zwei Gruppen teilen: 1. lange, fadenförmige, die einem gewöhnlichen Mycel um so ähnlicher sind, wenn Querwandbildung auftritt. Aller-

dings sind Querwände in der Regel nur äußerst selten zu beobachten. Häufig waren sie nur in einer bei 35° C gewachsenen, 5 Tage alten Oberflächenvegetation auf gehopfter Würze. 2. kürzere, rein gestreckt ellipsoidische. Diese haben jedoch meistens schon in der mannigfachsten Weise ausgesproßt bezw. keimschlauchartige Auswüchse an den verschiedensten Stellen gebildet, wodurch sie ein sehr bizarres Aus-

Fig 31. *Form 3.* 42 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bis 25° gewachsen; Absatz. Vergr. $\frac{635}{1}$.

sehen bekommen. Derart ausgewachsene Zellen bilden einen dritten Formenkreis (Fig. 28, 29 u. 30).

Die Größe der gestreckt ellipsoidischen Zellen ist 10—11 : 3,5—5 μ. Die langen, fadenförmigen Zellen bilden in älteren Kulturen eine dicht verfilzte Haut. Die einzelnen Fäden sind vielfach gewunden, und es wechselt ihr Durchmesser an verschiedenen Stellen von 2,4—7,0 μ. Ihre Länge ist sehr beträchtlich; die Fäden erstrecken sich oft über das ganze Gesichtsfeld und sogar darüber hinaus. An den Enden dieser Zellfäden ist meistens eine scharf abgesetzte An-

schwellung sichtbar. Die kürzeren Zellen sind oft nierenförmig oder an einem Ende zugespitzt. Sie gleichen nach ihrer Form völlig den Anschwellungen an den Enden der fadenförmigen Zellen; sie sind von diesen abgeschnürt worden. Neben den eben beschriebenen Zellformen treten dann wieder die durch Auswachsen an verschiedenen Stellen völlig unregelmäßig gewordenen Zellen, wie in jüngeren Kulturen, in großer Zahl auf. Die Bodensätze in Flüssigkeits-

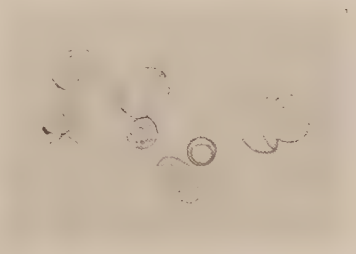


Fig. 32. *Form 3.* 14 Tage alte Strichkultur auf Kartoffel bei 25° gewachsen. Vergr. $\frac{635}{1}$.

kulturen enthalten meist nur die gedrungenen Zellformen (Fig. 31).

Die geschilderten Zellformen finden sich sowohl in Flüssigkeitskulturen, wie auch auf festen Nährböden vor. Nur in einer bei 25° C während 14 Tagen gehaltenen Kultur konnte eine Ausnahme festgestellt werden, indem sich hier fast nur kugelförmige Zellen mit reichlicher Vacuolisierung und mit einem Durchmesser von 6—11 μ, also Riesenzellen, vorfanden. Sie waren in eine schleimige, hautartige Masse eingebettet. Bei einzeln liegenden Zellen hatte sich, wie dies bei Riesenzellen der Torulaceen häufiger beobachtet wird, eine äußere Hautschichte abgelöst (Fig. 32). Die meisten Zellen waren tot. Die hautartige Masse,

in welche die Zellen eingebettet waren, färbte sich mit Jod-Jodkaliumlösung gelb.

Der Inhalt der fadenförmigen und der ellipsoidischen Zellen ist anfangs sehr blaß. In den fadenförmigen nimmt später das Lichtbrechungsvermögen des Plasmas zu. Nur wenige Granula sind vorhanden. Schließlich enthalten die Zellen große Vacuolen. Die Anschwellungen an den Enden der Zellfäden, die sich später loslösen, sind sehr reich an Plasma und zeigen keine weitere Differenzierung, als daß ab und zu ein stark lichtbrechendes Körperchen in ihnen auftritt. In alten Kulturen enthalten die Zellen viele gleichmäßig verteilte Fetttröpfchen, von denen einzelne sich in lebhafter Bewegung befinden. In solchen Kulturen tritt die Osmiumsäurereaktion an den stark lichtden Körperchen deutlich ein.

Mit Petroläther gewinnt man aus den getrockneten und zerriebenen Zellen einen schwach rot gefärbten Extrakt. Der nach dem Verdunsten des Petroläthers verbleibende Rückstand zeigt die Lipocyanreaktion.

Glykogen konnte nur in sehr jungen Kulturen nachgewiesen werden.

Form 4.

Gänzlich verschieden von den oben beschriebenen roten Sproßpilzen ist der mit Nr. 4 bezeichnete. Es ist eine von denjenigen Formen der *Fungi imperfecti*, bei welchen ein echtes, durch Querwände geteiltes Mycel vorhanden ist und gleichzeitig eine Vermehrung durch Sprossung stattfindet, und zwar treten beide Formen von vegetativen Zellen nebeneinander auf allen, sowohl flüssigen als festen Nährsubstraten ziemlich gleichmäßig auf.

Unter Hinweis auf die Abbildungen (Fig. 33—35) sei über die Erscheinungsformen dieses Pilzes folgen-

des gesagt. Die Wachstumsform bei Anwedung von Nährflüssigkeiten ist die Oberflächenvegetation. Infolgedessen werden nur geringe Absätze gebildet.

In 2 Tage alten, auf gehopfter Würze bei 25° gewachsenen Kulturen sind zwei Zellformen zu unter-

Fig. 33. *Form 4.* 2 Tage alte Kultur auf Würzegelatine bei 18° gewachsen; Randpartie. Vergr. $\frac{635}{1}$.

scheiden: 1. lange (bis zu 3 mm), verzweigte, dünne (1,75—3,5 μ Querdurchmesser) Fäden, bei welchen eine Querwandbildung nicht mit Sicherheit zu erkennen war. Der Inhalt besaß schaumig-körnige Beschaffenheit; 2. gestreckt ellipsoidische, an den Enden abgerundete Zellen, 7 : 3,5 μ groß (Fig. 33).

Die im Bodensatz vorhandenen Zellen sind in der Regel zwar dünn, ähnlich wie in der Haut, jedoch viel kürzer (gemessen wurden solche bis zu 28 μ Länge). Die gestreckt ellipsoidischen besitzen dagegen die gewöhnliche Größe.

Die Oberflächenvegetation einer 41 Tage alten Kultur in gehopfter Würze bestand aus sehr langen, dünnen Zellen wie in den jüngeren Kulturen; diese Fäden bildeten ein dichtes Flechtwerk. Dazwischen fanden sich wiederum die kurzen, gestreckt ellipsoidischen Zellen vor (Fig. 34).

In den dünnen, langen Zellen kommen manchmal dicht beieinander, manchmal in größeren Zwischenräumen abgelagert, stark lichtbrechende Körperchen vor. An anderen Stellen findet man Granulationen angehäuft. Die gestreckt ellipsoidischen Zellen weisen sehr oft an ihren beiden Enden je ein stark lichtbrechendes Körperchen auf, wodurch sie, ebenso wie durch eine leichte Krümmung der Zellen, eine gewisse Ähnlichkeit mit solchen der Gattung *Mycoderma* erhalten. In vielen Zellen fehlen regelmäßig gelagerte Einschlüsse oder aber es finden sich Granula in größerer Zahl vor.

In einer Kultur in neutralem Hefenwasser hatte sich nach 5 Monaten eine sehr dünne Haut, die von zahlreichen Kristallen eines nicht näher bestimmbaren Phosphates durchsetzt war, gebildet. Diese Haut bestand nur zum geringen Teil aus der Vegetation des Pilzes, sie war vielmehr in der Hauptsache auf eine Ausscheidung zurückzuführen. Offenbar ist neutrales Hefenwasser kein günstiger Nährboden für den Pilz. Bei einer nur geringen Massenentwicklung zeigten die fadenförmigen Zellen an verschiedenen Stellen blasen- und keulenförmige Anschwellungen. Gestreckt ellipsoidische Zellen waren in diesem Falle nicht vorhan-

den. Sie fehlten auch in der Oberflächenvegetation einer 40 Tage alten Kultur in neutralem Hefenwasser.

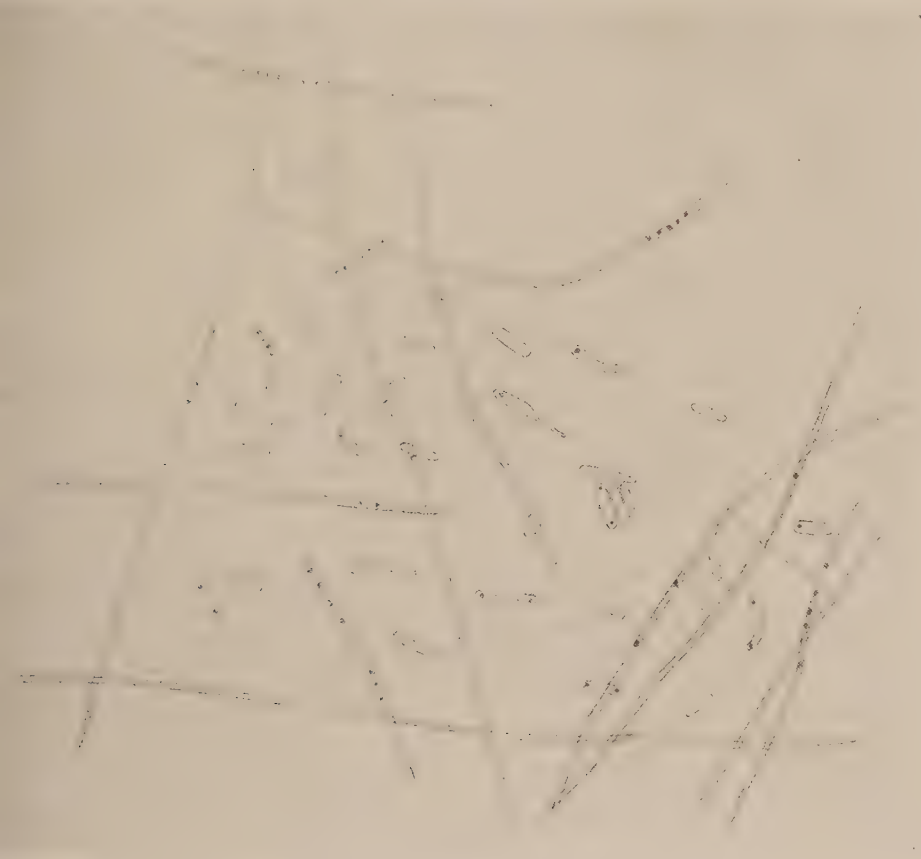


Fig. 34. *Form 4.* 41 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 25° gewachsen; Haut. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Die fadenförmigen Zellen, welche die Haut bildeten, hatten genau dasselbe Aussehen wie die in Würze gewachsenen.

Auf festen Nährböden traten, wie gesagt, die glei-

chen Zellformen in die Erscheinung, wie auf flüssigen. In den auf 10prozentiger Würzegelatine bei ca. 18° C gewachsenen Kolonien war die Rand- und die zentrale Partie gleichmäßig aus den beschriebenen Zellformen zusammengesetzt. In älteren Kulturen traten in der zentralen Partie fadenförmige Zellen von sehr verschiedener Dicke auf. Am Rand entwickelten sich dann aus den dicht verfilzten Zellen, welche die hautartige, zähe Kolonie bildeten, nur fadenförmige Zel-

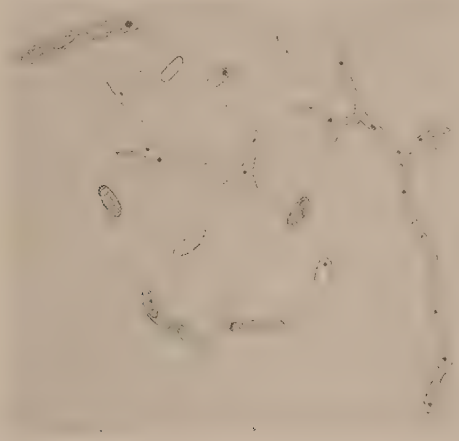


Fig. 35. *Form 4.* 14 Tage alte Kultur auf Würzegelatine bei 18° gewachsen; zentrale Partie. Vergr. $\frac{635}{1}$.

len, während in den übrigen Teilen der Kolonie der Pilz auch die gestreckt ellipsoidischen Zellen hervorgebracht hatte.

Auf der Oberfläche des zentralen Teils einer 14 Tage alten Kultur war die Mehrzahl der Zellen ungleichmäßig dick und wies viele kurze Verzweigungen auf. Sie machten ganz den Eindruck einer krankhaften Erscheinung. Die oben beschriebenen Zellformen fanden sich aber daneben auch vor (Fig. 35).

Der dichte Flaum, der die auf 10prozent. Rübenwassergelatine bei Zimmertemperatur gewachsenen Kolonien überzog, bestand wieder aus langen, fadenförmigen Zellen; im übrigen war die Kolonie aus den gleichen Zellelementen mit gleicher Verteilung wie die auf Würzegelatine gewachsenen zusammengesetzt.

Je nach dem Alter der Kultur sind in das im allgemeinen schwach lichtbrechende Plasma stark lichtbrechende Körperchen in verschiedener Anordnung eingelagert. Bei den jungen Kulturen sind stark lichtbrechende Körperchen noch nicht zu beobachten. Sie treten erst beim Altern der Kulturen auf. Bei den gestreckt ellipsoidischen Zellen sind sie, wie schon erwähnt, anfangs in beschränkter Anzahl (1--2) vorhanden; später erscheinen sie in größerer Zahl.

Wo die Granulationen in größerem Umfange auftreten, reagieren sie auf Ueberosmiumsäure mit schwarzbrauner Farbe. Bei schwächerer Granulation ist die Reaktion zweifelhaft.

Es ist anzunehmen, daß man bei den gestreckt ellipsoidischen Zellen zwei Arten von Oeltröpfchen zu unterscheiden hat. Die in älteren Kulturen beobachteten zahlreichen Fetttröpfchen sind jedenfalls nur auf Alterserscheinungen, Zerfall des Plasmas, wie bei den Saccharomyceten zurückzuführen. Dagegen sind die in jüngeren Kulturen in der Ein- bis Zweizahl auftretenden und dann zuweilen wie bei *Mycoderma* an den beiden Enden der Zellen gelagerten Fetttröpfchen vielleicht mit jenen bei *Mycoderma* vorkommenden in Parallele zu stellen.

Der Farbstoff, welcher ja auch nur in sehr geringer Menge in den Zellen enthalten ist, konnte mit Petroläther nicht ausgezogen werden. Der Petrolätherextrakt war nur schwach gelb gefärbt. Die Lipocyanreaktion gelang daher nicht.

Glykogenreaktion konnte in keinem Falle beobachtet werden.

Wachstumserscheinungen bei Anwendung flüssiger und fester Nährböden.

I. Flüssige Nährböden.

a) Tröpfchenkulturen.

In der Tröpfchenkultur besitzen wir ein Mittel, die Vermehrung einer Zelle durch Sprossung genau zu verfolgen. Außerdem zeigen die in den Tröpfchen gewachsenen Kolonien sehr charakteristische Merkmale, welche zur Unterscheidung der verschiedenen Gruppen von Sproßpilzen mit herangezogen werden können. Die Formen 1 und 2 können durch die Wachstumserscheinungen, welche sie im Würzetröpfchen zeigen, als zum Formenkreis der Torulaceen gehörig bestimmt werden, während die Formen 3 und 4 nicht dazu zu rechnen sind.

Die Tröpfchenkulturen wurden nach der Methode P. Lindners[24]) in der Weise angefertigt, daß auf ein Deckglas mittelst einer Zeichenfeder kleine Tröpfchen Würze, in welcher der betreffende Sproßpilz verteilt war, aufgetragen wurden. Zur Aussaat gelangten stets Zellen aus jungen, kräftigen Kulturen.

Die Zeichnungen wurden, wie alle übrigen, mit Hilfe des Abbeschen Zeichenapparates hergestellt.

Form 1.

Bei der Form 1 erfolgt die Vermehrung ausschließlich in der bekannten Weise durch Sprossung. Die junge Tochterzelle wird in der Regel an einem der Pole der Mutterzelle angelegt, jedoch kommen manchmal auch seitlich, in einem mehr oder weniger großen

Winkel zur Längsachse der Mutterzelle stehend, solche zur Ausbildung. In den jungen Tochterzellen bilden sich sehr bald stark lichtbrechende Tröpfchen. Aus einer Mutterzelle mit einer kleinen Tochterzelle entwickelten sich bei einer Temperatur von 18—20° C innerhalb 24 Stunden 9 neue Zellen (Fig. 36). Die Zellen bleiben nur kurze Zeit in Sproßverbänden zusammen. Sie liegen in einem dichten Haufen beieinander, von dessen Rand aus sie sich über das ganze Würzetröpfchen hin zerstreuen.

Fig. 36. *Form 1.* Sprossung in der Tröpfchenkultur. a nach 7 Std. b nach 24 Std. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Bezüglich der in den verschiedenen Nährflüssigkeiten auftretenden Zellformen und deren Beschaffenheit vergl. Abschnitt „Spezielle Morphologie".

Farbstoffbildung tritt in der Tröpfchenkultur, wenigstens während der 2—3tägigen Beobachtungszeit nicht ein. Dasselbe gilt auch von den drei anderen Formen.

Form 2.

Auch bei dieser Form erfolgt die Vermehrung durch typische Sprossung. Anfangs vollzieht sich diese immer an der gleichen Stelle der Mutterzelle, und zwar derart, daß die jüngere Tochterzelle die ältere verdrängt, die sich alsbald loslöst. Zuweilen macht es den Eindruck, als ob die abgetrennte Toch-

terzelle ihren Sproß an der Stelle anlegt, an der sie mit der Mutterzelle in Verbindung stand. Ein Beweis

Fig. 37. *Form 2.* Sprossung in der Tröpfchenkultur. a nach 15 Std., b nach 17 Std., c nach 17½ Std., d (etwa ⅕ aller Zellen) nach 40 Std. Vergr. $\frac{635}{1}$.

ließ sich jedoch dafür nicht erbringen, da sich die Zellen fortwährend in langsamer Bewegung befanden und ihre Lage änderten.

Erst in einer etwa 24 Stunden alten Kultur konnte

beobachtet werden, daß die Mutterzelle an beiden Polen nacheinander einen Sproß erzeugte. An einigen Zellen trat auch Kronenbildung auf.

Eine Differenzierung des Zellinhaltes durch Vacuolen und stark lichtbrechende Körperchen, wie es bei der Form 1 der Fall ist, war bis zum 4. Tag noch nicht erkennbar.

Die in Reihen angeordneten Sproßverbände bestehen selten aus mehr als vier Gliedern. Die aus

Fig. 38. *Form 3.* 6 Tage alte Kultur in gehopfter Würze bei 7—10° gewachsen; Hautinselchen. Vergr. $\frac{635}{1}$.

einer einzigen Zelle hervorgegangenen Sproßverbände liegen über das ganze Tröpfchen verstreut; unter günstigen Bedingungen ist dieses dicht von den Zellen des Pilzes erfüllt (Fig. 37).

Form 3.

Die Form 3 vermehrt sich ebenfalls durch Sprossung, wobei vielfach die Reihenfolge im Auftreten der Tochterzellen mit derjenigen bei den Saccharomyceten übereinstimmt. Es wird zunächst an dem

einen Pol der Zelle ein Sproß hervorgetrieben; wenn dieser einen größeren Umfang erreicht hat, sproßt er seinerseits wieder aus, während später am entgegengesetzten Pol der Mutterzelle eine neue Tochterzelle entsteht. Auch unmittelbar neben der ersten Tochter-

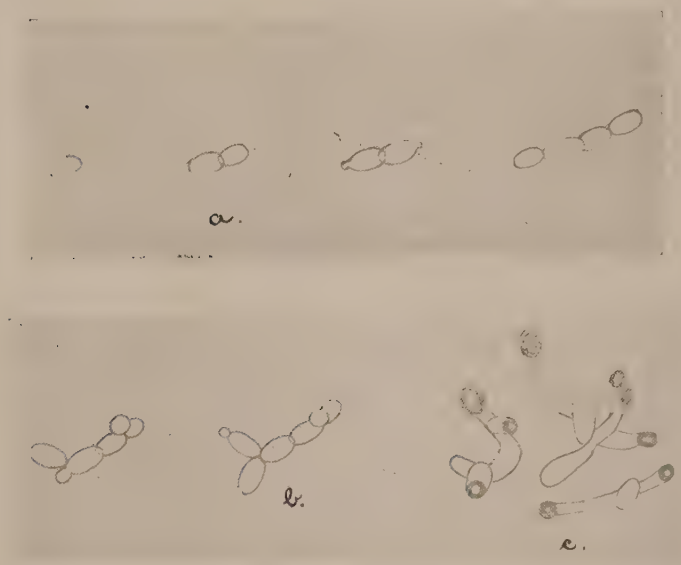


Fig. 39. *Form 3.* Sprossung in der Tröpfchenkultur. a nach 24 Std., b nach 31 Std., c (nur ein kleiner Teil der aus vielen Zellen bestehenden Kolonie) nach 48 Std. Vergr. $\frac{635}{1}$.

zelle kann von der Mutterzelle ein neuer Sproß entwickelt werden. Hierdurch entstehen verzweigte Sproßverbände, ähnlich denen der Saccharomyceten, die allerdings sehr bald auseinander fallen (Fig. 38).

Nach 48 Stunden entwickeln sich aus den elliptischen Zellen fadenförmige, die mit ihren Enden dann meistens aus dem Tröpfchen in die Luft hinausragen. Die Fäden werden sehr lang; wenn die Spitze eines

solchen Fadens am Rand des Tropfens angelangt ist, schiebt er die Flüssigkeit vor sich her über das Deckglas hin. Später wachsen die Fäden frei in die Luft hinaus. Sie besitzen zahlreiche kurze Abzweigungen.

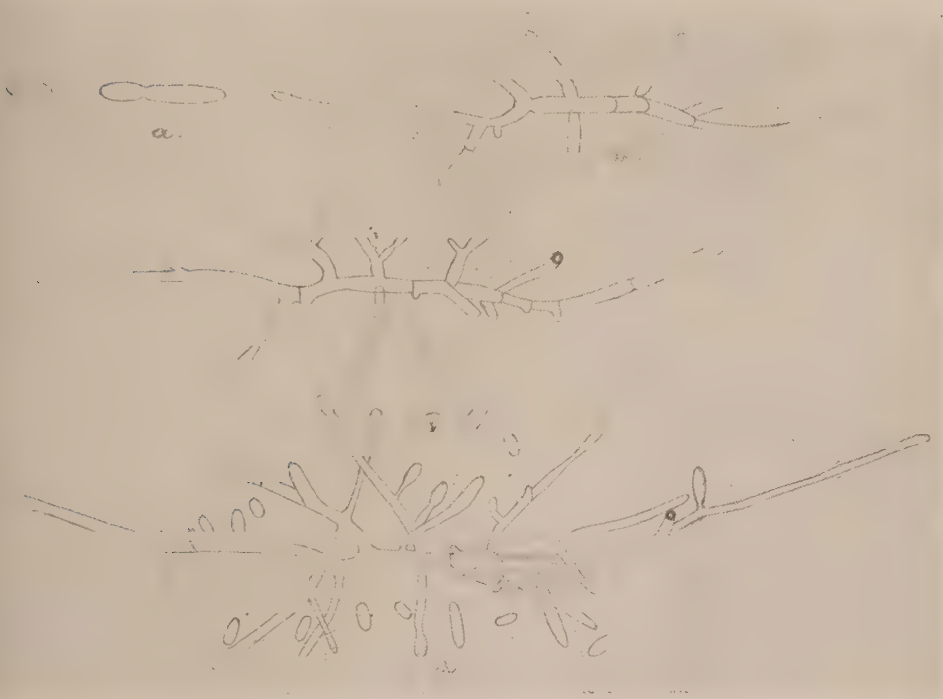


Fig. 40. Form 4. Sprossung in der Tröpfchenkultur. a nach 9 Std., b nach 25 Std., c nach 27 Std., d nach 33 Std. Verg. $\frac{635}{1}$.

Querwände treten jedoch nicht auf. Sobald die Spitzen in die Luft hinausgewachsen sind, bilden sie keulen- oder nierenförmige Zellen, die sehr leicht abfallen und allmählich einen sehr dünnen, aber schon mit unbewaffnetem Auge sichtbaren, weißen Belag am Boden der feuchten Kammer bilden (Fig. 39).

Form 4.

Aus einer gestreckt ellipsoidischen Mutterzelle bildet sich zuerst eine gleichgestaltete Tochterzelle, welche aber später zu einem Mycelfaden auswächst, der sich durch Erzeugung von seitlichen Sprossen verzweigt. Nach 25 Stunden zeigten sich in den fadenförmigen Zellen deutliche Querwände. Ueberall da, wo sich eine solche gebildet hatte, entstand ein Seitensproß. Jedoch entstehen Seitensprosse auch ohne vorausgegangene Querwandbildung in der Mutterzelle. Die Querwände sind ziemlich dick und stark lichtbrechend. Wir haben also bei diesem Pilz gleichzeitig eine Vermehrung durch Sprossung und durch Zellteilung (Fig. 40).

An den Enden der Seitenäste bilden sich keulenförmige Verdickungen, welche sich abschnüren und als gestreckt ellipsoidische Zellen zwischen den fadenförmigen liegen. In 4 Tage alten Kulturen trifft man sehr gleichmäßige Zellen stellenweise in größerer Anzahl gehäuft an. An der Abschnürungsstelle sproßt nämlich alsbald wieder eine neue Zelle hervor, die wiederum abfällt, sowie sie eine bestimmte Größe erreicht hat. Dieser Vorgang wiederholt sich immer von neuem.

In den sehr langen Fäden, welche schließlich das ganze Deckglas wie ein Netz überzogen, ja selbst zwischen Objekträger und Deckglas hindurch wuchsen, wurden Querwände nicht mehr in allen Fällen mit Sicherheit beobachtet.

b) Wachstumserscheinungen in größeren Mengen von Nährflüssigkeit.

1. Gehopfte Bierwürze (11—12° B).

Form 1.

Die bei 25° C im Thermostaten aufgestellten Kulturen zeigten am 2. Tag deutliches Wachstum. Auf der Oberfläche der Würze schwammen einzelne Kolonien von unbestimmter Form. Sie können am besten als schlierenartig bezeichnet werden. Rotfärbung war an ihnen bereits deutlich zu erkennen. Am 5. Tag hatten sich diese Schlieren zu Hautinseln von ganz unregelmäßiger Gestalt und von schleimiger Beschaffenheit ausgestaltet. Zur Bildung einer zusammenhängenden Haut, die nur einige Lücken hatte, kam es nur bei einer 4 Jahre alten Kultur in einem Pasteurkolben mit 0,5 l Würze Inhalt. Diese Haut gehört dem Typus III nach der von Will[40]) getroffenen Einteilung der verschiedenen Hautformen in 3 Untergruppen, an. In kleineren Kulturgefäßen kam es niemals zur Ausbildung einer zusammenhängenden Oberflächenvegetation, sondern die einzelnen Hautinseln sanken, wenn sie eine bestimmte Größe erreicht hatten, zu Boden. Schon am 9. Tag war der rot gefärbte Bodensatz ziemlich beträchtlich. Die Würze war trüb. Der Absatz wurde immer stärker und in alten Kulturen in Freudenreichkölbchen hatte sich nach und nach der ganze Inhalt in eine braunrote, schleimige und fadenziehende Masse verwandelt.

Aus dem geschilderten Verhalten geht also hervor, daß der Organismus, obwohl luftliebend, im allgemeinen nicht befähigt ist, sich lange Zeit an der Oberfläche zu halten. Wenn die Anschauung richtig ist, daß die auf der Flüssigkeitsoberfläche sich ent-

wickelnden Organismen direkt oder indirekt durch die Oelkörperchen schwimmend erhalten werden, so dürfte dies doch für den vorliegenden, sehr fettreichen Pilz nicht zutreffen.

Bei sehr alten Kulturen in Erlenmeyerkölbchen, die vollständig eingetrocknet waren, zeigte sich nach dem Aufweichen mit frischer steriler Würze nach einigen Tagen ein weißer Ring am Rande der Flüssigkeit. Dieser Ring bestand aus toten Zellen, die vollständig mit einer stark lichtbrechenden Substanz erfüllt waren, welche offenbar das Aufsteigen der toten Zellen aus dem Absatz an die Oberfläche bewirkte.

Bei Zimmertemperatur (18—20° C) am Licht aufgestellte Kulturen zeigten am 2. Tag über dem Rand der Nährflüssigkeit an der Wand des Kulturgefäßes kleine, weiße Kolonien, die sich sehr bald zu einem Ring zusammenschlossen. Am 3. Tag war der Ring schon deutlich rot gefärbt. Auf der Würzeoberfläche begannen sich rote Schlieren zu bilden. Weiterhin verhielten sich die Kulturen genau so wie die im Thermostaten aufgestellten, nur war ihr Wachstum ein langsameres als bei jenen.

Form 2.

Bei 25° C zeigte sich an den Kulturen am 2. Tag ein weißer, unzusammenhängender Ring. Am 3. Tag war der Ring fast vollständig geschlossen und von ihm aus ragten weißliche, lappige Hautstücke in die Flüssigkeitsoberfläche hinein. Rotfärbung sowohl des jetzt geschlossenen Ringes, als der kaum stärker entwickelten Hautstücke wurde erst am 5. Tag wahrgenommen. Schon am 9. Tag war der Bodensatz ziemlich stark, während die Oberflächenvegetation gleich schwach blieb.

Die gleichen Wachstumserscheinungen zeigten

sich an den Kulturen, welche bei Zimmertemperatur am Licht aufgestellt waren.

In einer 4 Jahre alten Kultur hatte sich ein etwa 1,5 cm hoher orangeroter Ring gebildet. Eine Haut war nicht entstanden, nur einige kleine schleimige Hautinseln schwammen auf der Würzeoberfläche. Die Würze war klar und dunkel. Der starke Absatz hatte eine dunkelbraune Färbung angenommen.

Form 3.

Die Entwicklung der Kulturen machte sich bei 25° C am 2. Tag bemerkbar. Am Rand der Flüssigkeit zeigten sich einzelne graue, matt aussehende Inselchen. Diese vergrößerten sich ziemlich rasch, und schon am 6. Tag war eine vollständig zusammenhängende Haut gebildet. Sie war matt, rosa gefärbt und sah wie weiß bestäubt aus. Die Farbstoffbildung tritt also wie bei den Formen 1 und 2 in den ersten Entwicklungsstadien noch nicht in die Erscheinung. Der Farbstoff dürfte also demnach auch hier an die Fetttröpfchen gebunden sein.

Am 21. Tag war noch kaum ein Absatz vorhanden, dagegen hatte sich eine sehr starke Haut entwickelt. Sie war derb, grob gekröseartig gefaltet und lebhaft rosa gefärbt. An der Wandung des Kulturgefäßes war sie etwa 0,5 cm über den Flüssigkeitsspiegel in die Höhe gewachsen.

Etwas verlangsamt treten die gleichen Erscheinungen an den bei 18—20° C und am Licht gehaltenen Kulturen auf.

Starke Absätze findet man nur in alten Kulturen; sie bestehen der Hauptsache nach aus untergesunkenen Teilen der Haut. Eine 4 Jahre alte Kultur besaß eine dicke, stark gefaltete, braunrote Haut. In die tiefen Falten war Würze eingedrungen, und auf deren

Oberfläche hatte sich wieder ein dünnes, fettig glänzendes Häutchen gebildet. Am Boden des Kolbens lag eine vollständig zusammenhängende, dicke, untergesunkene Haut. Außer dieser war noch ein brauner Absatz vorhanden. Die Würze erschien dunkel gefärbt aber klar.

Nach allen Erscheinungen ist die Form 3 gleichfalls sehr luftliebend. Sie entwickelt sich zunächst an der Oberfläche in Form einer den Oberflächenvegetationen von *Mycoderma* ähnlichen, mattgrau gefärbten Haut. Die Entwicklung ist eine verhältnismäßig rasche; jedenfalls geht sie schneller vor sich als bei den Formen 1 und 2.

Form 4.

Die Entwicklung ist bei dieser Form eine viel langsamere als bei den Formen 1—3. Sie tritt erst am 6. Tag in die Erscheinung. Bei 25° C (im Dunkeln) bildete sich ein Ring von schwach gelblicher Farbe und einzelne fettig glänzende Hautinseln. An der Glaswand, etwa 1 cm über der Flüssigkeitsoberfläche, zeigten sich strahlige, weiße Flecken, die genau wie ein Schimmelmycel aussahen. Am 7. Tag war der Ring geschlossen. Am 21. Tag reichte der Ring etwa 0,5 cm tief in die Flüssigkeit hinein und ebenso weit über die Oberfläche hinauf. Er war gelblich gefärbt. Auch ein starker Bodensatz hatte sich gebildet. Im weiteren Verlauf wächst vom Rand aus die Haut ringförmig gegen die Mitte zu. In Kulturgefäßen mit kleiner Würzeoberfläche (Freudenreichkölbchen) ist dann allmählich die ganze Oberfläche mit einer derben, zähen, gelblichen, glatten, nach dem Rand zu dicker werdenden Haut bedeckt, welche sich in ihrer Gesamtheit herausnehmen läßt, also infolge der langen Zellfäden einen sehr festen Zusammenhang besitzt.

Die bei Zimmertemperatur am Licht aufgestellten Kulturen wachsen langsamer als die bei 25° im Dunkeln gehaltenen. Am 6. Tag waren einzelne Inseln auf der Flüssigkeit und dicht an der Glaswand sichtbar. Außerdem waren auch an der Wandung die erwähnten mycelartigen Flecken vorhanden, von denen der höchste sich 3—4 cm über der Würzeoberfläche befand. Nach 21 Tagen war der Ring kräftig, aber weniger stark als der bei 25° C gewachsene entwickelt. Der etwa 1 mm hohe, an der Glaswand emporgewachsene, nicht benetzte Teil des Ringes war intensiv ziegelrot gefärbt. Außerdem wuchsen noch mycelartige, farblose Fäden etwa 1 cm hoch an der Wand hinauf. Der untergetauchte Teil des Ringes war gelblich gefärbt. Die Flecken oben am Glas veränderten sich mit der Zeit nicht weiter. Der Bodensatz war wie bei den Kulturen bei 25° C, stark.

In einer 4 Jahre alten Kultur war der Ring 4—5 cm hoch und ragte etwa 1 cm weit in die Flüssigkeit hinein. Er war in den untersten Partien dunkelbraun gefärbt; diese Zone wurde nach oben zu allmählich heller, dann folgte eine mißfarbige rosa Zone und darüber ein etwa 1,5 cm breiter, gelber Streifen. Die die Flüssigkeit ganz bedeckende Haut war gelbbraun. Der starke, aber sehr lockere Absatz war dunkelbraun. Die Würze war dunkel gefärbt und trüb.

2. Neutrales Hefenwasser.

Form 1.

In diesem, für andere Sproßpilze sehr günstigen Nährboden entwickelte sich die Form 1 nur äußerst langsam. Nach 40 Tagen hatte sich nur ein geringer, schwach rosa gefärbter Bodensatz gebildet. Haut- und Ringbildung fehlten. Nur einzelne weiße Ko-

lonien waren an der Gefäßwandung längs des Flüssigkeitsrandes entstanden.

Aus der Nährlösung schieden sich im Laufe der Zeit Kristalle von Magnesiumammoniumphosphat ab.

In einer 5 Monate alten Kultur war der Absatz nur sehr gering und Oberflächenvegetation fehlte gänzlich. Farbstoff war so viel wie keiner gebildet worden. Die Zellen waren alle tot.

Das neutrale Hefenwasser ist also für die Form 1 kein günstiger Nährboden. Erhält das Hefenwasser einen Zusatz von Zucker, so ist das Wachstum der Form 1 sowohl als auch der Formen 2, 3 und 4 ein viel besseres.

Form 2.

Auch für die Form 2 ist neutrales Hefenwasser kein günstiger Nährboden. In einer 40 Tage alten Kultur war nur ein sehr geringer, fast weißer Bodensatz entstanden.

Form 3.

Nach 40 Tagen hatte sich in neutralem Hefenwasser nur eine sehr dünne, unzusammenhängende, nicht gefärbte Haut und ein schwacher, gleichfalls ungefärbter Bodensatz gebildet.

Im Gegensatz zu den Formen 1 und 2 bildet die Form 3 auch auf ihr nicht zusagenden Nährlösungen eine Haut.

Form 4.

Wie die Formen 1—3 entwickelte sich auch die Form 4 in Hefenwasser nur äußerst langsam und kümmerlich. In einer 40 Tage alten Kultur war nur eine sehr dünne, ungefärbte Haut und gar kein Bodensatz gebildet worden.

3. Hefen-Zuckerwasser.

In je 100 ccm der 8prozentigen Zuckerlösungen, welche sich in Erlenmeyerkölbchen befanden, wurde eine Platinöse voll von dem betreffenden Sproßpilz geimpft. Als Aussatmaterial dienten 14 Tage alte Strichkulturen auf gehopfter Würzegelatine.

Die beobachteten Wachstumserscheinungen sind in den Tabellen S. 68—71 zusammengestellt.

4. Heudekokt.

Als Kulturgefäße dienten, ebenso wie bei Milch, mit Watte verschlossene Reagenzröhrchen, die mit je 10 ccm der Nährflüssigkeit beschickt waren. Eingeimpft wurde eine Platinöse voll von dem betreffenden Organismus.

Form 1.

Die ersten Anzeichen einer Vermehrung machten sich durch eine leichte Trübung der Nährflüssigkeit am 2. Tag bemerkbar. Am 3. Tag war ein schwacher Ring vorhanden, der aber bei der geringsten Erschütterung zu Boden sank. Rosafärbung trat in sehr geringem Grade erst am 6. Tag in die Erscheinung. Am 9. Tag konnte ein deutlich rosa gefärbter, schwacher Absatz festgestellt werden. Ring und Bodensatz nahmen innerhalb einer längeren Beobachtungszeit nur wenig an Stärke zu. Heudekokt ist also kein günstiger Nährboden für die Form 1 und bietet charakteristische, für die Diagnose brauchbare Merkmale nicht dar.

Form 2.

Schon am 1. Tag nach der Einsaat zeigten sich einzelne kleine Hautinselchen und am 2. Tag war fast die ganze Oberfläche der Nährflüssigkeit damit be-

Form 1

Nach Tagen	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Milchzucker
76	Ziegelroter, ca. 1/2 cm hoher, nicht vollständig zusammenhängender Ring. Kleine, weiße Kolonien, die ziemlich dicht beisammen liegen, bedecken die Gefäßwand bis 3 cm über dem Flüssigkeitsspiegel. Keine Haut. Mäßiger, roter Absatz. Flüssigkeit trüb.	Intensiv rot gefärbter, nahezu vollständiger Ring von etwa 1/2 cm Höhe. Einzelne kleine Hautinselchen. Mäßiger, hellroter Absatz. Flüssigkeit trüb.	Ziegelroter, ca. 1/2 cm hoher, unzusammenhängender Ring. An der Gefäßwandung einzelne kleine, runde, weiße Kolonien bis etwa 3 cm über dem Flüssigkeitsspiegel. Sehr schwache Hautbildung (nicht zusammenhängend) Absatz mäßig, rot gefärbt. Flüssigkeit trüb.	Zusammenhängender, ca. 1/2 cm hoher Ring, der im oberen Teil rot, gegen unten mehr violett gefärbt ist. Isolierte, kleine weiße Kolonien an der Gefäßwand wie bei Dextrose. Flüssigkeitsoberfläche mit lückenhafter, sehr zarter Haut bedeckt. Absatz mäßig, locker, rot mit einem Stich ins bläuliche Flüssigkeit trüb.	Schwacher, unterbrochener Ring. Isolierte kleine weiße Kolonien wie bei Saccharose. Sehr zarte, infolgedessen kaum sichtbare, größere Hautinseln. Geringer, roter Absatz. Flüssigkeit klar.
260	Ring wie oben. Starker, roter Absatz. Flüssigkeit trüb.	Ring bräunlich gefärbt. Keine Haut. Ziemlich starker, roter Absatz. Flüssigkeit klar.	Wie oben. Absatz stark.	Ring wie oben. Keine Haut. Starker Absatz.	Wie oben. Geringer Absatz.

Form 2

Nach Tagen	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Milchzucker
76	Schwach rot gefärbter, mit senkrechten Falten versehener ca. 1/2 cm hoher Ring. Hautinseln von verschiedener Größe. Mäßiger, roter Absatz. Flüssigkeit trüb.	Braunroter, ca. 1/2 cm hoher Ring. Einzelne, teilweise miteinander verschmelzende, schleimige Hautinseln. Mäßiger, roter Absatz. Flüssigkeit trüb.	Braunroter, ca. 1/2 cm hoher Ring. Schwache Hautbildung. Mäßiger, roter Absatz. Flüssigkeit trüb.	Roter, ins Violette spielender, ca. 1/2 cm hoher Ring. Keine Hautbildung. Geringer roter Absatz mit einem Stich ins Violette. Flüssigkeit trüb	Unvollständiger, einige mm hoher Ring. Keine Hautbildung. Geringer, roter Absatz. Flüssigkeit klar.
260	Der ganze Kolbeninhalt bildet eine gelatinöse Masse.	Wie oben. Absatz ziemlich stark.	Keine Haut. Starker, roter Absatz. Flüssigkeit klar.	Der ganze Inhalt des Kulturkolbens stellt eine rote gelatinöse Masse dar.	Wie oben.

Form 3

Nach Tagen	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Milchzucker
76	Rötlicher, ca. 1 cm hoher Ring. Haut rot, derb, stark gekröseartig gefaltet, weiß bestäubt aussehend, einzelne ganz weiße Flecken. Absatz sehr gering. Flüssigkeit klar.	Gelber, ca. 1/2 cm hoher Ring. Dicke, stark gefaltete Haut von fettigem Aussehen und bräunlich-roter Farbe. Mäßiger Absatz. Flüssigkeit klar.	Ziegelroter, 1 cm hoher Ring. Haut rot, stark gefaltet, in den tieferen Partien fettig glänzend, die höheren wie bestäubt aussehend. Mäßiger Absatz. Flüssigkeit klar.	Ring lebhaft rot mit einem Stich ins Violette. Haut weniger stark gefaltet wie in den anderen Kulturen. Die höheren Wulste sehen wie bestäubt aus und es zeigen sich darauf einzelne ganz weiße Flecken. Im übrigen ist die Farbe dieselbe wie die des Ringes. Geringer Absatz. Flüssigkeit klar.	Kein Ring. Einzelne sehr zarte Hautinselchen. Absatz sehr gering.
260	Haut stark gefaltet, gelb gefärbt, nur an der Unterseite mit einigen roten Flecken. Sie sieht nicht mehr bestäubt, sondern schleimig aus. Der geringe Absatz besteht aus untergesunkenen Teilen der Haut. Flüssigkeit klar.	Einzelne derbe, schleimig aussehende Hautinseln von gelber Farbe. Absatz stark, größtenteils aus untergesunkenen Hautstücken bestehend, gelb. Flüssigkeit trüb.	Haut größtenteils untergesunken, der noch schwimmende Rest gelb, fettig glänzend und wenig gefaltet. Absatz stark, rot. Flüssigkeit trüb.	Keine Haut. Starker, roter Absatz. Flüssigkeit klar.	Kein Ring. Keine Haut. Sehr geringer Absatz. Flüssigkeit trüb.

Form 4

Nach Tagen	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Milchzucker
76	Ring ca. 2 cm hoch, unten orange, oben citronengelb gefärbt. Vom Ring aus zieht sich über die Flüssigkeit ein schmaler Hautstreifen. Absatz gering. Flüssigkeit klar.	Ring ca. 2½ cm hoch, stark gekröseartig gefaltet und rosa gefärbt. Haut dick, knorpelig, gelb. Absatz sehr gering. Flüssigkeit klar.	Ring ca. 2 cm hoch, unten weiß, darüber eine scharf abgesetzte, rote Zone, oben wieder weißlich bis gelb. Keine Haut. Geringer Absatz. Flüssigkeit klar.	Ring ca. 1 cm hoch, wie bei Galaktose gefärbt. Keine Haut. Absatz sehr gering. Flüssigkeit klar.	Kein Ring. Dicke, knorpelige, fast weiße Haut. In der Mitte befindet sich eine kreisrunde, ca. 1½ cm im Durchmesser haltende Öffnung. Fast kein Absatz. Flüssigkeit klar.
260	Derbe, schleimig aussehende Haut von gelber Farbe mit einigen rosa gefärbten Zonen ist zu Boden gesunken. Flüssigkeit klar.	Haut zu Boden gesunken. Sie ist an der Unterseite rosa, oben gelb gefärbt. Sonst fast kein Absatz. Flüssigkeit klar.	Ring sehr dick. Haut untergesunken. Sonst wie oben.	Ring ca. 4–5 cm hoch, vertrocknet, braun. Derbe, gelbe Haut, nur am Übergang zum Ring Rotfärbung. Fast kein Absatz Flüssigkeit klar.	Wie oben.

deckt. Sie besaßen fettigen Glanz. Am 3. Tag war Rosafärbung an ihnen wahrzunehmen. Außerdem hatte sich ein ca. 1 mm hoher, weißer Ring gebildet. Bis zum 5. Tag hatte sich die Haut vollständig geschlossen und rosa gefärbt; einige fettig glänzende Flecken waren auf ihr sichtbar, im übrigen hatte sie ein mattes Aussehen. Auch der Ring war jetzt rosa gefärbt. Am 9. Tag bildete die Oberflächenvegetation eine feste, fettig glänzende Haut. Bodensatz war nicht entstanden und bildete sich auch nach längerer Zeit nicht. Auch für die Form 2 ist also Heudekokt ein ungünstiger Nährboden.

Form 3.

Einzelne kleine Hautinselchen waren schon am 1. Tag nach der Einimpfung bemerkbar. Am 2. Tag bedeckten diese sehr kleinen und zarten Gebilde schon die ganze Oberfläche der Nährlösung. Sie waren grau und besaßen einen fettigen Glanz. Ganz schwache Rosafärbung der Oberflächenvegetation war am 5. Tag zu erkennen. Am 5. Tag hatte sich die Haut zwar vollständig geschlossen, jedoch konnten die sie zusammensetzenden kleinen Inselchen noch deutlich unterschieden werden. Inzwischen war es auch zur Entwicklung eines verhältnismäßig starken, rosa gefärbten Ringes gekommen. Am 9. Tag erschien die Oberflächenvegetation hellrosa gefärbt bei mattem Aussehen. Auch ein schwacher Bodensatz war vorhanden. Später sank dann die Haut teilweise unter. Für die Form 3 ist also Heudekokt ebenso wie für die Formen 1 und 2 ein ungünstiges Nährsubstrat.

Form 4.

Weiße, ziemlich große Flocken, die in der Flüssigkeit suspendiert waren, ließen am 3. Tag erkennen,

daß ein Wachstum erfolgt; sie vermehrten sich verhältnismäßig rasch. Ringbildung begann am 5. Tag, und zwar war der Ring weiß; er nahm jedoch schon am 6. Tag eine gelbliche Farbe an. Am 9. Tag war die Haut vollständig; starker Ring. Die in der Flüssigkeit suspendierten Flocken hatten eine ziemlich beträchtliche Größe erreicht und sich zum Teil am Boden abgesetzt. Oberflächenkultur und Absatz waren gelb gefärbt. Weiterhin nahmen Haut und Bodensatz noch beträchtlich an Umfang zu.

Wenngleich auch für die Form 4 Heudekokt kein besonders günstiger Nährboden ist, so ist doch ihr Wachstum ein viel besseres als das der Formen 1—3.

5. Milch.

Form 1.

Das Wachstum der Form 1 ist auf Milch sehr langsam und schwach. Am 2. Tag zeigten sich einzelne rote Inselchen und am 3. Tag ein schwacher Ring. Während die Farbstoffbildung in den Heudekoktkulturen erst am 6. Tag zu erkennen war, begann sie auf Milch schon am 2. Tag. Nach 17 Tagen hatte sich ein verhältnismäßig starker, rot gefärbter Ring und Absatz gebildet. Die Milch war eigentümlich wässerig und gelb geworden.

Form 2.

Noch schlechter als die Form 1 wächst auf Milch die Form 2. Am 2. Tag zeigten sich einige rote Inselchen und am 3. die Anfänge eines Ringes. Absatz und Ring waren am 17. Tag noch sehr gering. Die Milch zeigte keine Veränderung.

Form 3.

Das Wachstum begann am 3. Tag sichtbar zu wer-

den, indem einige fettig aussehende Inselchen sich gebildet hatten. Bis zum 17. Tag war nur ein schwacher Ring und Absatz entstanden. Eine Veränderung der Milch ließ sich äußerlich nicht erkennen.

Form 4.

Relativ am besten von den vier Sproßpilzen wächst auf Milch die Form 4. Sie hatte nach 17 Tagen eine starke, knorpelige Haut von gelblicher Farbe gebildet. In der Milch konnten drei scharf abgegrenzte Zonen unterschieden werden. Die unterste hatte das ursprüngliche Aussehen, die mittlere war etwas dunkler geworden, während die oberste gelb, wässerig und fast durchsichtig geworden war.

6. Elfvings Lösung.

In der Einleitung wurde schon erwähnt, daß Elfvings rot gefärbter Sproßpilz ohne organisches Nährmaterial selbständig vegetieren kann, jedoch nur im Licht und zwar nur in ziemlich intensivem Licht. Im Dunkeln ist diese rote Hefe nicht imstande, sich weiter zu entwickeln. Der rote Farbstoff würde also in diesem Falle die gleiche Funktion ausüben wie das Chlorophyll.

Nach Hansen[14]) berichtet Elfving über seinen Versuch wie folgt.

„Eine unsichtbare Spur von den roten Hefenzellen wurde am 5. Juli 1885 in ca. 50 ccm einer Lösung, welche auf 100 ccm Wasser 1 g Magnesiumsulfat, 1 g Kaliumnitrat und eine ganz minimale Menge Eisenchlorid enthielt, ausgesät. Die Kulturen wurden an ein Südfenster gestellt. Schon nach drei Tagen war eine deutliche Vermehrung bemerkbar. Infolge einer Reise konnten in den nächsten Wochen die Beobach-

tungen nicht verfolgt werden. Die Kulturen standen fortwährend am Südfenster, vor welchem aber jetzt ein weißes Rouleau niedergelassen war, um zu starkes Erwärmen, respektive Verdunsten zu vermeiden. Am 5. August war der Boden des Kolbens von einem lockeren, hellroten, aus lauter noch in Sprossung befindlichen Saccharomyceszellen gebildeten Niederschlag bedeckt, dessen Trockengewicht 0,010 g ausmachte. Bei dem geschilderten Versuch war der Nährflüssigkeit eine kleine Menge Eisenchlorid zugesetzt; dieser Zusatz stellte sich später als unnötig heraus."

Der angezogene Versuch gab die Anregung, auch die vorliegenden Formen in der gleichen Richtung zu prüfen, unter Benützung der gleichen Nährlösung, überhaupt unter möglichst gleichen Versuchsbedingungen. Es wurden zwei Versuche durchgeführt, und zwar der eine im Frühjahr, der andere im Sommer. Beidemale waren die Kulturen am Fenster aufgestellt und über 3 Monate hindurch beobachtet worden. Gleichzeitig waren in einer Versuchsreihe Kulturen auf einem vom Fenster 3 m entfernten Tische aufgestellt worden.

Die Einsaat war so gering, daß während der ersten Tage weder eine Trübung noch ein Absatz bemerkbar war.

Eine Entwicklung fand in sämtlichen Kulturen statt, sie war jedoch sehr schwach.

Ein Unterschied zwischen den dicht am Fenster und den auf dem Tisch aufgestellten Kulturen, soweit sich dies nach Absatzbildung usw. bemessen ließ, bestand nicht, so daß also eine Beeinflussung durch das Licht nicht festgestellt werden konnte.

Im einzelnen ergaben sich für die vorliegenden Formen folgende Beobachtungen.

Form 1.

Geringer, schwach rosa gefärbter Absatz. Auf der Oberfläche schwimmen einzelne sehr zarte Hautinselchen, die nur sichtbar sind, wenn man schräg von unten her gegen die Oberfläche sieht. Die Zellen, welche die gewöhnliche Form besitzen, zeichnen sich dadurch aus, daß die Zellhaut nicht verschleimt. Deshalb waren auch viele Sproßverbände mit bis zu 10 Zellen vorhanden. Kronenbildung wurde nicht selten beobachtet. Tote Zellen waren nur in geringer Menge vorhanden.

Form 2.

Sehr geringer Absatz, der nur ganz schwache Rosafärbung erkennen läßt. Hautinseln wie bei Form 1 schwer sichtbar. Die Zellen besitzen das gewöhnliche Aussehen.

Form 3.

Sehr geringer Absatz und viele ganz kleine, schwach rosa gefärbte Hautinselchen. Die gedrungenen ellipsoidischen Zellformen herrschen vor; auch unregelmäßig geformte Zellen sind vorhanden. Fadenförmige Zellen fehlen ganz.

Form 4.

Sehr geringer, weißer, flockiger Absatz. Hautinselchen schwer sichtbar. Die Oberflächenvegetation besteht aus langen, sehr dünnen Fäden mit kurzen seitlichen Ansätzen. Im Absatz finden sich auch vereinzelt gestreckt ellipsoidische Zellen vor.

7. Seewasser.

Fischer und Brebeck[8]) geben von ihrem *Blastoderma salmonicolor* an, daß es sich in reinem See-

wasser nicht unbeträchtlich vermehrte, zur Hautbildung aber nicht kam. Da die Form 3 große Ähnlichkeit mit *Blastoderma salmonicolor* besitzt, wurde sie und auch die drei anderen Formen auf ihr Verhalten in reinem Seewasser geprüft. Das Wasser stammte aus dem Adriatischen Meer.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf das Aussehen der Kulturen am 35. Tag.

Form 1.

Sehr geringer, schwach rosa gefärbter Absatz und sehr zarte, kaum sichtbare Hautinselchen. Die Form der Zellen war normal; Verschleimung der Zellmembran fand nicht statt. Große Oelkörperchen fehlten.

Form 2.

Spur Absatz und sehr kleine Hautinselchen von ganz schwacher Rosafärbung. Zellform normal.

Form 3.

Einzelne lebhaft rosa gefärbte Hautinselchen von verschiedener Größe, z. T. verhältnismäßig dick. Die gedrungenen, ellipsoidischen Zellen herrschten vor, jedoch waren auch fadenförmige und unregelmäßig geformte, sowie viele Riesenzellen vorhanden.

Form 4.

Flüssigkeit durch weiße Flocken, welche aus langen, mycelähnlichen Fäden und nur vereinzelten gestreckt ellipsoidischen Zellen bestanden, getrübt.

Der Versuch zeigt also, daß alle vier Formen in Seewasser zu vegetieren vermögen. Verhältnismäßig am besten gedeiht die dem *Blastoderma salmonicolor* Fischer und Brebeck ähnliche Form 3, bei der allein es auch zu einer stärkeren Farbstoffbildung kommt.

Das Verhalten der vier Formen in Seewasser bietet durchaus nichts Auffallendes. Ist ja doch das Vorkommen von Sproßpilzen im Meere bekannt. Zumal in nördlichen Gebieten scheinen sie regelmäßig vorzukommen.[35])

8. Peptonlösung mit Zusatz von Äthylalkohol und von organischen Säuren.

Zur Feststellung der Wachstumshemmung durch Äthylalkohol wurden die vier Organismen in Peptonlösung, welche Zusätze von Alkohol in verschiedener Stärke erhielt, geimpft, ferner in Peptonlösung mit verschiedenen organischen Säuren zur Bestimmung der Säureverzehrung. Ausführliche Angaben über die Versuchsanstellung werden weiter unten mitgeteilt. An dieser Stelle seien nur Angaben über die Wachstumserscheinungen in den genannten Nährflüssigkeiten gemacht.

Bei allen vier Formen war das Wachstum in den alkoholhaltigen Nährlösungen langsamer und geringer als in Würze. Die Wachstumserscheinungen sind die gleichen wie dort. Nur bei der Form 3 zeigte sich insofern eine Abweichung, als die Rotfärbung eine viel schwächere war.

In den Peptonlösungen mit Säurezusatz war ebenfalls die Form 3 schwächer gefärbt als in Würzekulturen. Sonst ergaben sich bei keiner Form Abweichungen vom gewöhnlichen Bild.

Aus den vorstehenden Angaben ist ersichtlich, daß von den verwendeten flüssigen Nährböden Bierwürze den vier Formen am besten zusagt. Schlecht eignen sich neutrales Hefenwasser, Heudekokt, Milch, Pep-

tonlösung mit verschiedenen Zusätzen und ferner, wie zu erwarten war, Elfvings mineralische Nährlösung und Seewasser.

Während die Farbstoffbildung in Würze und Milch gut ist, ist sie in Heudekokt nur schwach. Ebenso tritt Farbstoffbildung in neutralem Hefenwasser bei den Formen 1 und 2 nur sehr schwach auf und bleibt bei 3 und 4 gänzlich aus; in Peptonlösung zeigt die Form 3 nur schwache Färbung.

Gute Ernährungsbedingungen bietet Hefenwasser mit Zusatz von verschiedenen Zuckerarten. Form 1 wächst gut in Dextrose-, Lävulose-, Galaktose- und Saccharose-Hefenwasser. Weniger günstig ist Milchzucker. Die Farbstoffbildung ist überall gut, sehr intensiv aber bei Saccharose und Lävulose. Für die Form 2 sind von den Zuckernährlösungen diejenigen mit Dextrose, Lävulose und Galaktose die günstigsten. Weniger gut ist Hefenwasser mit Saccharosezusatz, am schlechtesten ein solches mit Milchzucker. Die Farbstoffbildung ist bei allen diesen Nährlösungen, mit Ausnahme bei Milchzuckerzusatz, sehr intensiv. Die Form 3 wächst weniger gut nur in der Milchzuckerlösung, in allen anderen aber gut. Auch die Farbstoffbildung, die in den übrigen Lösungen sehr intensiv ist, bleibt in der Milchzuckerlösung nur sehr schwach. Auffallend erscheint, daß bei langem Stehen der rote Farbstoff der Form 3 in den Oberflächenvegetationen, offenbar unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs, allmählich verschwindet und einer gelben Färbung Platz macht. Die Absätze dieser Kulturen bleiben dagegen rot bis braunrot. In Würze wurde diese Erscheinung nicht beobachtet. Für die Form 4 ist Lävulose und Milchzucker günstig. Weniger gut ist Dextrose. Es folgt dann Galaktose und endlich Saccharose. Die Rotfärbung bleibt bei Milch-

zucker nahezu ganz aus, bei den übrigen Zuckerarten ist sie ziemlich stark.

II. Feste Nährböden.

a) Einzellkulturen.

Die Einzellkulturen, d. h. Kulturen, bei denen je eine Kolonie des betreffenden Pilzes aus einer einzigen Zelle hervorgegangen ist, können für sich nicht ohne weiteres zur Diagnose der Arten herangezogen werden, da bei ein und demselben Organismus doch recht beträchtliche Variationen möglich sind. Neben anderen Unterscheidungsmerkmalen können sie aber doch bei der Vergleichung verschiedener Arten Verwertung finden. Zur Vervollständigung des Gesamtbildes erschien es daher nötig, auch die Wachstumserscheinungen der vier Formen von roten Sproßpilzen in der Einzellkultur zu beobachten.

H. Will[41]) unterscheidet bezüglich der Wachstumsform der Kolonien in der Einzellkultur 3 Grundformen. Die Kolonien vom Typus I besitzen regelmäßige, sog. „Maulbeerform“ oder „Zapfenform“. Dem Typus II gehören solche Kolonien an, welche in ihren Umrissen zwar unregelmäßig erscheinen, aber doch einen regelmäßigen, sich mehr oder weniger der Kugelform nähernden Kern besitzen („platzende Bombe“ und „Polypenform“). Der Typus III ist völlig unregelmäßig.

Zur Ausführung der Einzellkulturen wurde folgendermaßen verfahren. Bei 35° C verflüssigte, sterile, 10prozentige gehopfte Würzegelatine wurde mit einer kleinen Menge des betreffenden Organismus gut vermischt und von dieser Mischung mittels der Platinöse eine dünne Schicht auf ein Deckglas aufgetragen. Das

Deckglas mit der erstarrten Gelatineschicht erhielt unter Abdichtung mit Vaseline seinen Platz auf dem Ring einer Böttcherschen feuchten Kammer. Sodann wurden einige gut isolierte, kräftige Zellen mit Hilfe des Mikroskops aufgesucht und zur weiteren Beobachtung markiert.

Form 1.

Die Sprossung vollzieht sich in der Einzellkultur auf Würzegelatine ebenso wie im Würzetröpfchen

Fig. 41. *Form 1.* Einzelkultur in Würzegelatine. a nach 7 Std. Vergr. $\frac{635}{1}$, b nach 24 Std. Vergr. $\frac{270}{1}$.

(Fig. 41). Die entstehenden Kolonien sind von völlig unregelmäßiger Gestalt (Typus III). Die dünne Gelatineschicht wird ziemlich rasch verflüssigt, worauf sich die Zellen voneinander lostrennen und getrennt, höchstens noch zu zweien vereint, nach allen Richtungen hin über die Oberfläche der verflüssigten Gelatine zerstreuen. Im Gegensatz zu den Kulturen im Würzetröpfchen macht sich an den Kolonien auf Gelatine schon nach 24 Stunden deutliche Rotfärbung bemerkbar.

Form 2.

Wie im Würzetröpfchen, entstehen auch in der Gelatinekultur die Tochterzellen anfänglich nur an

einem Pol der Mutterzelle. Da sich in dem festen Nährboden die Tochterzellen nicht loslösen können, bilden sie einen dichten Haufen um den Pol der Mutterzelle, an dem zunächst die Sprossung erfolgt war. Sechseinhalb Stunden nach der Aussaat hatte eine Zelle vier Tochterzellen hervorgebracht, von denen schon eine wieder eine Tochterzelle erzeugte. Nach 9 Stunden bestand die kleine Kolonie aus 11 Zellen, und nach 24 Stunden war sie schon mit unbewaffne-

Fig. 42. *Form 2.* Einzellkultur in Würzegelatine. a nach 9 Std., Vergr. $\frac{635}{1}$, b nach 24 Std. Vergr. $\frac{270}{1}$.

tem Auge als winziges rotes Pünktchen wahrzunehmen. Die Kolonien sind zwar auch unregelmäßig geformt, unterscheiden sich aber von denen der Form 1 dadurch, daß sie mehr abgerundet sind; sie nähern sich dem Wachstumstypus II (Fig. 42).

Form 3.

Während im Würzetröpfchen die Sproßfolge dieselbe ist wie bei den Saccharomyceten, also die Sprossung abwechselnd an beiden Polen oder wenigstens in deren nächster Nähe erfolgt, vollzieht sich dagegen

die Sprossung in Gelatine anfänglich nur an einer einzigen, eng umgrenzten Stelle der Zelle. Nach 23 Stunden waren aus einer Zelle 11 neue hervorgegangen, 4 von denen unmittelbar aus der Mutterzelle, die übrigen verdankten ihren Ursprung zweien dieser Tochterzellen. Die Kolonie bestand 41 Stunden nach der

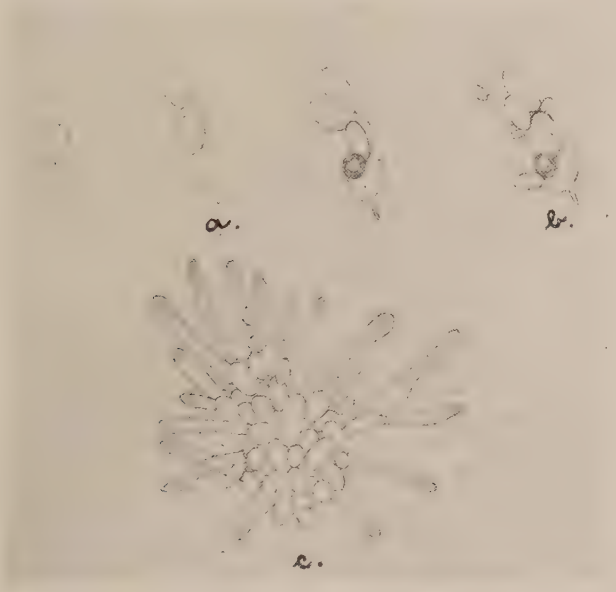


Fig. 43. *Form 3.* Einzellkultur in Würzegelatine. a nach 18 Std., b nach 23 Std., c nach 48 Std. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Aussaat aus zahlreichen Zellen und war schon unter einer schwachen Lupe deutlich zu sehen (Fig. 43).

Die Form der Kolonie ist unregelmäßig. Die Zellen des Kernes sind gestreckt ellipsoidisch. Aus diesem Kern wachsen langgestreckte, fadenförmige Zellen hervor, welche eine Strecke weit innerhalb der Gelatine wachsen, sich dann aber der Oberfläche zu-

wenden und endlich in die Luft hinausragen. Sobald dieser Abschnitt des Wachstums erreicht ist, entstehen an der Spitze oder wenigstens in ihrer Nähe keulenförmige, nierenförmige oder auch ellipsoidische Anschwellungen, die sehr leicht abfallen, genau so wie es im Würzetröpfchen der Fall ist (Fig. 44).

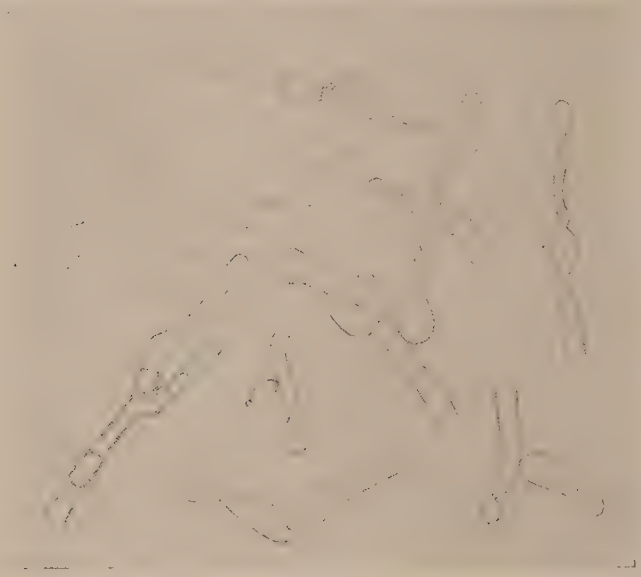


Fig. 44. *Form 3.* Einzellkultur in Würzegelatine; 65 Std. alt. Spitzen von fadenförmigen Zellen, welche aus der Gelatine in die Luft hinausragen. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Wurde am Boden der Böttcherschen feuchten Kammer eine dünne Schicht Würzegelatine ausgebreitet, so beginnen die abgefallenen Zellen mit regelmäßig geformten Zellen auszusprossen. Die so entstehenden Kolonien sind nach einigen Tagen größer als die am Deckglas hängenden Mutterkolonien. Hat man den

Boden der feuchten Kammer nicht mit Gelatine bedeckt, so bleibt eine Vermehrung der abgefallenen Zellen aus, und es entstehen nur an irgend einer Stelle der Zelle mehr oder weniger lange „Keimschläuche“ (Fig. 45). Die Flächenausdehnung der sekundären Kolonien entspricht genau derjenigen der Mutterkolonien.

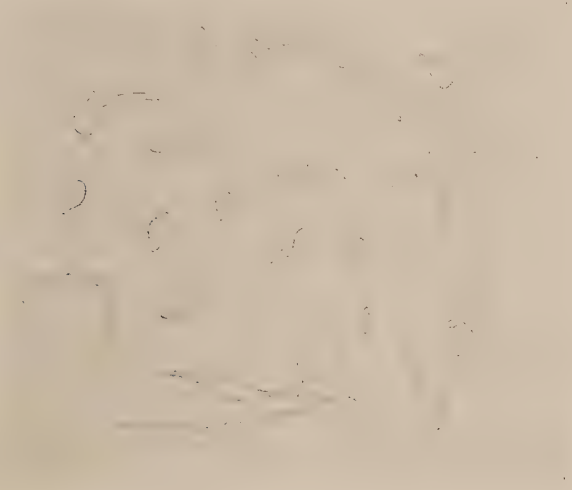


Fig. 45. *Form 3.* Einzellkultur in Würzegelatine. Zellen, die von den in die Luft hinausgewachsenen Fäden abgefallen sind und sich am Boden der feuchten Kammer angesammelt haben. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Form 4.

An einem der Pole einer gestreckt ellipsoidischen Mutterzelle sproßt zunächst eine Tochterzelle hervor, welche jener mit sehr breiter Basis aufsitzt. Die zweite Tochterzelle entsteht am entgegengesetzten Pol der Mutterzelle. Die aus den Tochterzellen sich entwickelnden Sprosse werden sehr langgestreckt und teilen sich durch Querwände in kürzere Glieder. Auch

zwischen den gestreckt ellipsoidischen Sproßzellen entstehen breite Querwände. Nach und nach bilden sich an den Zellen, wie im Würzetröpfchen Seitensprosse, wodurch die Kolonie ein „bäumchenartiges“ Aussehen erhält (Fig. 46).

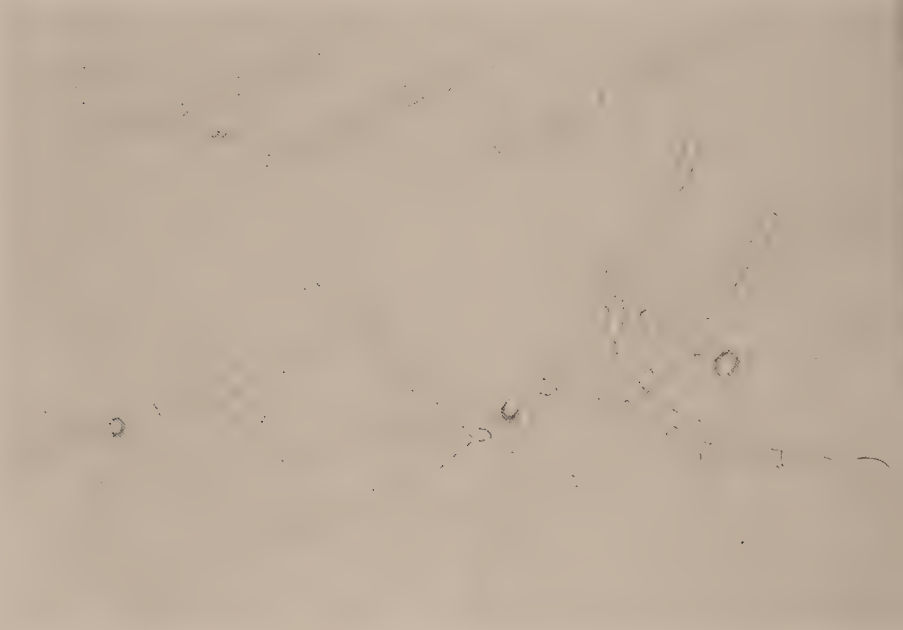


Fig. 46. *Form 4.* Einzellkultur in Würzegelatine. a nach 18 Std., b nach 24 Std., c nach 42 Std. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Wenn nach etwa 48 Stunden die Gelatine verflüssigt ist, bilden sich an den Zweigen der Kolonie ellipsoidische Zellen, die zunächst den Eindruck von „Kronenbildung“, wie sie bei manchen Sproßpilzen (Saccharomyceten, Torula) vorkommt, machen; sehr wahrscheinlich aber ist die Erscheinung darauf zurückzuführen, daß die an den Seitenzweigen entstehenden

„Konidien“ an Ort und Stelle verbleiben und nicht sofort, wie in den Flüssigkeitskulturen abfallen. Einzelne dieser Konidienbündel lösen sich in ihrer Gesamtheit und als Bündel in Zusammenhang bleibend ab. Erst wenn die Gelatine sehr dünnflüssig geworden ist, fallen sie auseinander; man findet dann zwischen den jetzt ein dichtes Geflecht bildenden fadenförmigen Zellen die gestreckt ellipsoidischen in großer

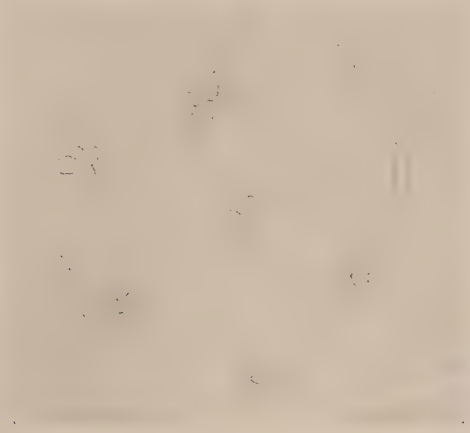


Fig. 47. *Form 4.* Einzellkulturen in Würzegelatine nach 72 Std. Konidienbündel. Vergr. $\frac{635}{1}$.

Menge vor. Das Bild ist jetzt das gleiche wie im Würzetröpfchen (Fig. 47).

b) Riesenkolonien.

Von ungleich größerer Bedeutung als die Einzellkolonien sind für die Diagnose eines Sproßpilzes die Riesenkolonien. Die charakteristischen Wachstumserscheinungen, welche in den Riesenkolonien auftre-

ten, sind sehr konstant, und Unterschiede, welche sich bei Anwendung verschiedener Nährböden ergeben, sind stets nur gradueller, aber niemals prinzipieller Natur.[42])

Die Anlage der Kolonien erfolgte in der Weise, daß mittelst eines Kapillarröhrchens ein kleiner Tropfen einer jungen, kräftigen, in Würze herangezüchteten Kultur auf den festen Nährboden aufgetragen wurde. Die Nährböden befanden sich in einer etwa 2,5 cm hohen Schicht in kleinen Erlenmeyerkölbchen mit einem Fassungsvermögen von ca. 60 ccm. Die Kölbchen waren mit Watte verschlossen. Die Kulturen wurden einige Meter von einem nach Norden gelegenen Fenster entfernt aufgestellt. Die Temperatur im Laboratorium betrug durchschnittlich 18° C.

1. Würzegelatine.

Form 1.

Schon am 2. Tag nach der Aussaat zeigte die Kolonie von etwa 4 mm Durchmesser lebhafte Rotfärbung. Die Oberfläche war glatt und glänzend. Nach einigen weiteren Tagen verlor die Oberfläche etwas von ihrer Glätte und nahm ein matteres Aussehen an. Die Kolonie stellte in diesem Entwicklungszustand einen kreisrunden, nicht sehr dicken Belag dar. Auf der Oberfläche der Randzone konnte eine feine radiale Streifung wahrgenommen werden. Der Rand selbst war ganz schwach gebuchtet. Die ganze Kolonie erschien etwas in die Gelatine eingesenkt. Am 6. Tag begann bereits die Verflüssigung der Gelatine, welche am 10. Tag schon so weit vorgeschritten war, daß manchmal die Kolonie zum Teil auf den Grund der muldenförmigen, mit verflüssigter Gelatine angefüll-

ten Vertiefung in der noch festen Gelatine untergesunken war. Die weiteren Wachstumserscheinungen glichen von da an denjenigen in Flüssigkeitskulturen. Wenn die Kolonie nicht in der verflüssigten Gelatine untersank, so zeigte ihre Oberfläche nach ca. 1 Monat eine rosettenartige Zeichnung, die wahrscheinlich, ähnlich wie bei manchen Torulaceen, durch stärkeres lokales Wachstum hervorgerufen worden war. Manchmal war die Oberfläche stellenweise mit kleinen, warzenartigen Erhöhungen bedeckt (Tafel I, Fig. 1).

Die Riesenkolonie, die eine zähe, teigige Beschaffenheit besitzt, setzt sich in allen ihren Teilen aus gestreckt ellipsoidischen Zellen zusammen. Ein Unterschied zwischen den Zellen der Randzone und denjenigen aus dem zentralen Teil besteht insofern, als bei den ersteren stark lichtbrechende Körperchen nahezu fehlen, während sie bei den letzteren reichlich vorhanden sind und zum Teil beträchtliche Größe besitzen; überdies finden sich hier auch mehr oder weniger große Fettkügelchen außerhalb der Zellen in großer Zahl vor (Fig. 19). In ganz jungen, etwa 2 Tage alten Kolonien lassen sich diese Unterschiede nicht feststellen. Der Zellinhalt verhält sich also genau so wie bei Flüssigkeitskulturen. Riesenzellen treten in allen Teilen der Kolonie auf.

Form 2.

Die von Anfang an stark rot gefärbte Kolonie war nicht so lebhaft glänzend wie die der Form 1. Sehr bald kam es zur Bildung einer wallartigen Erhebung am Rand. Nach 8 Tagen zeigte der Rand eine deutliche radiale Streifung. Der innere, scharf abgesetzte, etwas tiefer liegende Teil der Kolonie besaß eine glatte, matte Oberfläche. Nach Verlauf von

weiteren 8 Tagen betrug der Durchmesser der Kolonie ca. 1 cm. Der in der Mitte sich erhebende Wall fiel nach beiden Seiten zu gleichmäßig ab. Der äußere Teil besaß ein etwas matteres Aussehen als der innere und war radial gestreift (Taf. I Fig. 2).

Der ganze, nicht sehr dicke Belag stellte eine gleichmäßige, teigige Masse dar. Die Zellen, welche die Kolonie zusammensetzen, haben durchweg ellipsoidische bis gestreckt ellipsoidische Form. In der äußersten Randpartie ganz junger Kolonien findet man nur kleine, sehr blasse Zellen ohne stark lichtbrechende Körperchen. Derartige Zellen setzen auch in älteren Kolonien den äußersten Rand zusammen. Weiter gegen die Mitte zu sind die Zellen etwas größer und enthalten schon vielfach 1—2 stark lichtbrechende Körperchen, während im zentralen Teil alle Zellen ein bis viele solche Körperchen besitzen (Fig. 24).

Form 3.

Einen Tag nach der Aussaat sah der auf die Gelatine aufgetragene Tropfen grau und wie bestäubt aus. Schon am nächsten Tag war deutliche Rotfärbung zu erkennen. Die Entwicklung der Kolonie erfolgt viel rascher als bei den zwei ersten Formen; am 3. Tag war bereits ein Durchmesser von ca. 8 mm erreicht und eine starke Kräuselung der ganzen Kolonie eingetreten. Nach Verlauf von 14 Tagen war die Kolonie, die jetzt einen Durchmesser von über 2 cm besaß, grob gefaltet. Die Anordnung dieser Falten zeigte eine gewisse Regelmäßigkeit insofern, als sie der Hauptsache nach radial verliefen. Entsprechend der Faltung erschien die wallartig erhöhte Randzone der Kolonie gelappt. Zunehmendes Alter der Kolonie verwischte die Regelmäßigkeit der Faltung vollständig. Während bis zu diesem Entwicklungsstadium

die ganze Oberfläche matt und weiß bestäubt aussah, traten jetzt glänzende und daher dunkler rot aussehende Stellen in die Erscheinung. An solchen glänzenden Stellen waren die Falten etwas flacher geworden. Im allgemeinen drangen aber die Falten sehr tief in das Nährsubstrat ein (Tafel I, Fig. 3).

Die ganze Kolonie ist trocken und bröckelig. An welcher Stelle der Kolonie und zu welcher Zeit man auch immer eine Probe entnimmt, stets findet man die gleichen Zellelemente: lange, fadenförmige Zellen mit ihren keulenförmigen Verdickungen und kurze, gestreckt ellipsoidische mit oder ohne „keimschlauchartigen" Auswüchsen (vergl. auch Abschnitt „Spezielle Morphologie") (Fig. 29).

Werden die Riesenkolonien in den Erlenmeyerkölbchen stärker bewegt, was sich ja bei der täglichen Beobachtung nicht vermeiden läßt, so entstehen sehr bald über die ganze Gelatineoberfläche hin zerstreut sekundäre Kolonien, welche dieselben Wachstumserscheinungen zeigen wie die Stammkolonie (Taf. II, Fig. 10). Bleiben dagegen die Kulturen völlig ruhig stehen, so kommt es nicht zur Entstehung sekundärer Kolonien. Da kein Zusammenhang der Kolonien innerhalb der Gelatine besteht, können die sekundären Kolonien nur dadurch entstanden sein, daß sich Zellen, die konidienartig an keimschlauchähnlichen Fäden entstanden waren, von der Stammkolonie abgetrennt haben und beim Bewegen der Kultur über die Gelatine hin zerstäubt worden sind. Daß der Vorgang sich wirklich so abspielt, geht auch aus dem schon geschilderten Verhalten der Form 3 in der Einzellkultur hervor, wo sich die abgefallenen Zellen unter der Stammkolonie am Boden der feuchten Kammer ansammeln.

Es sei hier noch erwähnt, daß *Blastoderma salmonicolor* Fischer und Brebeck auf dieselbe Weise sekundäre Kolonien auf festen Nährböden bildet.

Wurden die Gelatinekulturen der Form 3 in Petrischalen angelegt und diese, nachdem die Kolonien gut entwickelt waren, umgedreht, so entstanden in dem jetzt unten liegenden Deckel „Spiegelbilder" der Kolonien, die aus abgefallenen Zellen bestanden. Ein Ausschleudern von Zellen aus der Riesenkolonie infolge von Gasentwicklung im Innern der Kolonie, wie das für die Torula Nr. 36 von Janssens und Mertens angegeben wird, findet hier sicher nicht statt.

Diese beiden Autoren haben nämlich an Serienschnitten, welche senkrecht durch die gehärteten und in Paraffin eingebetteten Kolonien ausgeführt wurden, die Beobachtung gemacht, daß sich unterhalb der Kolonie Hohlräume in der Gelatine befanden. Aus der Oberfläche der Kolonien, welche sich in den verkehrt aufgestellten Petrischalen hängend entwickelten, ragten mikroskopisch kleine „Stalaktiten" von halbverflüssigter Gelatine hervor. Diese „Stalaktiten" standen hier und da mit den Hohlräumen in Verbindung und sind zweifellos aus diesen ausgetreten. Die Verfasser nehmen nun an, daß gleichzeitig mit der Verflüssigung der Gelatine eine Art Gärung vor sich gehe. Das dabei sich entwickelnde Gas soll die Höhlungen ausfüllen und die verflüssigte Gelatine herauspressen. Sie führen weiter aus, daß vermöge der Schwerkraft allein die dickflüssige Masse nicht durch die feinen Kanäle austreten könnte, da 1. der atmosphärische Druck, 2. die Kapillarität sich der Schwere entgegensetzen und 3. selbst mit viel weniger viskosen Flüssigkeiten sich niemals so mikroskopisch kleine Tropfen bilden. Kämen solche wirklich zu-

stande, so würden sie sehr bald zusammenfließen und herabfallen.

Bezüglich der Gasentwicklung sagen die Verfasser selbst, daß diese Erscheinung ihnen ganz unerklärlich bleibe, da sie an der Torula Nr. 36 niemals Gärvermögen feststellen konnten.

Der Druck des Gases im Innern eines Hohlraumes kann sich so weit steigern, daß mit Zellen vermischte Tröpfchen buchstäblich aus der Kolonie herausgeschleudert werden. Die Tröpfchen fallen auf den unten liegenden Deckel der Petrischale und bilden dort die „Spiegelbilder", welche genau den Umfang der Stammkolonie haben. Aus dem Umstande, daß die Zellen, welche die „Spiegelbilder" zusammensetzen (Taf. II, Fig. 11), sich ohne Zuhilfenahme von Wasser nur verhältnismäßig schwer vom Glas loslösen lassen, schließen die Verfasser, daß das Festkleben der ausgeschleuderten Zellen durch anhängende und später eintrocknende Gelatine veranlaßt ist, daß also tatsächlich ein Gemenge von Gelatine und Zellen von der Kolonie herabfällt und nicht nur einzelne freie Zellen.

Gegen diese Deutung der beobachteten Erscheinung lassen sich folgende Einwände erheben. Unter den Kolonien, welche in der Petrischale heranwuchsen, befanden sich nach der Angabe der Verfasser auch solche, welche zunächst keine „Spiegelbilder" erzeugten. Diese Kolonien unterschieden sich von den anderen, die ein mattes, sammtartiges Aussehen hatten, dadurch, daß ihre Oberfläche glatt und glänzend war. Das matte, sammtartige Aussehen einer Kultur kommt nun dadurch zustande, daß fadenförmige Zellen aus der Kolonie herauswachsen. Solange dies nicht der Fall ist, behält die Oberfläche ihre Glätte und ihren Glanz. Aus der Zeichnung (Fig. 13), welche Zellen aus einer alten Gelatinekultur dar-

stellt, ersieht man nun tatsächlich, daß aus ellipsoidischen Zellen ein mehr oder weniger langes, fadenförmiges Gebilde herauswächst, an dessen Ende wieder eine ellipsoidische Zelle entsteht. Da nun die „Spiegelbilder" ausschließlich aus ellipsoidischen Zellen zusammengesetzt sind und niemals fadenförmige Zellen gefunden wurden, ist es jedenfalls natürlicher anzunehmen, daß die an den Enden der aus der Kolonie herausgewachsenen Fäden entstandenen ellipsoidischen, konidienartigen Zellen sich abgetrennt haben und heruntergefallen sind, als die Zuflucht zu einer unter den gegebenen Verhältnissen ganz unerklärlichen hypothetischen Gasentwicklung zu nehmen.

Das Fehlen der „Spiegelbilder" unterhalb der Kolonien mit glatter und glänzender Oberfläche erklärt sich ganz zwanglos dadurch, daß bei diesen eben noch keine fadenförmigen Zellen mit den konidienartigen Gebilden an ihrer Spitze aus der Kolonie herausgewachsen sind und infolgedessen auch ein Abwerfen jener Zellen nicht erfolgen konnte. Allmählich nahmen die anfänglich noch glänzenden Kolonien auch ein mattes Aussehen an, und alsbald entstanden die „Spiegelbilder".

Ungelöst bleibt die Frage, warum an den Kolonien, die sich innerhalb der Gelatine, unter denen jedenfalls auch solche waren, die sich sehr nahe an der Gelatineoberfläche befanden, entwickelten, keine Gasbildung stattfand; wenigstens schweigen sich die Verfasser hierüber aus.

Endlich ist noch anzuführen, daß auch ohne die Mitwirkung der verflüssigten und dann eintrocknenden Gelatine Zellen am Glas sehr fest haften können. Bei den „Spiegelbildern" der Form 3 kleben die Zellen auch sehr fest und es gelangt sicherlich nicht die geringste Spur Gelatine aus der Kolonie heraus. Die

große Adhäsion der Zellen zum Glas kann also keinesfalls als Beweis dafür dienen, daß tatsächlich mit Zellen beladene Gelatinetröpfchen von der Kolonie ausgeschleudert werden, wie Janssens und Mertens glauben.

Bekannt ist die Tatsache, daß bei vielen Sproßpilzen die Zellmembran oder wenigstens eine äußere Schicht von ihr mehr oder weniger aufgequollen ist. Diese aufgequollene Schicht kann aber jedenfalls beim Eintrocknen wesentlich dazu beitragen, daß die Zellen an ihrer Unterlage fest haften.

Form 4.

Die einen Tag alte Kolonie, die schon etwas größer als der aufgetragene Tropfen war, hatte graue Färbung und eine vollkommen glatte und glänzende Oberfläche. Zwei Tage später machte sich auf der Oberfläche der Randzone eine deutliche radiale Streifung bemerkbar. Der zentrale Teil der Kolonie zeigte unregelmäßig angeordnete Erhöhungen. Die Farbe war silbergrau und der Glanz seidenartig. Die radiale Streifung der Randzone entwickelte sich allmählich zu einer ebenso verlaufenden Fältelung. Etwa am 6. Tag war die ganze Oberfläche, ausgenommen eine schmale Randzone, mit einem weißen Luftmycel bedeckt, und zwar im zentralen Teil besonders dicht. Nach und nach legten sich diese feinen Fasern um und verschwanden dadurch für das unbewaffnete Auge. Ab und zu blieben wohl einzelne dicke „Zotten“ stehen, die durch Zusammenkleben vieler einzelner Fasern entstanden waren. Das Umlegen des Luftmycels begann in der Mitte der Kolonie und schritt von hier aus nach außen langsam weiter. Bei manchen Kolonien war das Luftmycel schon nach 14 Tagen gänzlich verschwunden,

während andere noch nach 3 Wochen mit einem dichten weißen Flaum bedeckt waren (Tafel I, Fig. 4).

Die Farbstoffbildung machte sich bei den Kulturen, die dem Tageslicht ausgesetzt waren — im Dunkeln blieben die Kolonien überhaupt grau — etwa am 10. Tag durch eine ganz schwache Rosafärbung der zentralen Partie bemerkbar. Nach weiteren 14 Tagen war die ganze Kolonie rosa gefärbt. Die Färbung trat bei verschiedenen Kolonien, die unter den gleichen Bedingungen herangewachsen waren, mit verschiedener Intensität auf. Einen Grund für diese Erscheinung vermag ich nicht anzugeben.

Der Durchmesser etwa 3 Wochen alter Kolonien betrug 4—4,5 cm. Sie bildeten einen sehr derben, zähen, in der Mitte wie am Rand ziemlich gleichmäßig dicken Belag, der sich wie bei vielen Schimmelpilzen leicht in seiner Gesamtheit von der Gelatine abheben ließ. Auf dieser zeigten sich dann Vertiefungen, die genau der Fältelung der Kolonie entsprachen.

Ein aus dem weißen Flaum hergestelltes mikroskopisches Präparat zeigt lange, dünne, verästelte Fäden mit Querwänden, also ein typisches Mycel. An den Spitzen der kurzen Seitenäste (Konidienträger) sind gestreckt ellipsoidische Zellen abgeschnürt, die sich sehr leicht abtrennen, denn viele der stark zugespitzten Seitenäste tragen keine Zellen mehr und außerdem sind abgetrennte, gestreckt ellipsoidische Zellen in großer Zahl vorhanden. Die Fäden sind granuliert, während die gestreckt ellipsoidischen Zellen, die Konidien, eine Differenzierung ihres Inhaltes meist nicht erkennen lassen. Nur wenige enthalten ein bis mehrere stark lichtbrechende Körperchen (Fig. 33).

An der Unterseite der Kolonie findet man die langen Fadenzellen nicht, dagegen kürzere, oft stark

gewundene und geknickte. Am häufigsten sind kurze Zellen, die manchmal an einem Ende zugespitzt sind. Der zähe Belag besteht aus einem dichten Geflecht langer Mycelfäden, dazwischen finden sich aber immer auch gestreckt ellipsoidische Zellen, teilweise sprossend, reichlich vor. Auch ganz unregelmäßig geformte Zellen werden ab und zu gefunden (Fig. 35).

2. Kartoffelwassergelatine.

Im wesentlichen sind die Kolonien auf Kartoffelwassergelatine ähnlich denen auf Würzegelatine. Es ergeben sich nur graduelle Unterschiede.

Form 1.

Während der ersten Tage glich der Verlauf der Entwicklung völlig demjenigen bei Kolonien auf Würzegelatine. Die kleine Kolonie war kreisrund, rot gefärbt und glänzend. Später wurde die Oberfläche matter und körnig. Nach 15 Tagen hatte die Kolonie einen Durchmesser von ca. 12 mm erreicht. Der größte Teil der Oberfläche war maulbeerartig mit dicht beisammen stehenden Höckerchen bedeckt. Kleinere Partien des Belages waren auf der Oberfläche glatt und mit konzentrischen Streifen versehen. Der Rand der Kolonie verlief regelmäßig (Taf. I, Fig. 5).

Bezüglich der Form und der Beschaffenheit der die Kolonie zusammensetzenden Zellen gilt das über die Kolonien auf Würzegelatine Gesagte.

Form 2.

Die Oberfläche der 6 Tage alten, schon von Anfang an lebhaft rosa gefärbten Kulturen war körnig und matt. Durchmesser der Kolonien nach 15 Tagen ca. 13 mm. Die zentrale Partie mit flachen Höckerchen

bedeckt. Rings um jene eine wallartige Erhöhung. Die Randpartie stromartig*) ausgebildet (Taf. I, Fig. 6).

Der Zustand der Kolonie sowie das Aussehen der Zellen zeigten keinerlei Abweichung von der früher für Würzegelatine beschriebenen Beschaffenheit und Form.

Form 3.

Bei dieser Form trat bei einer 15 Tage alten Kultur insofern ein Unterschied gegenüber den Riesenkolonien auf Würzegelatine hervor, als bei jener die Faltung viel feiner und gedrängter war. Im allgemeinen zeigten die Falten eine radiale Anordnung. Durch tiefere, ziemlich geradlinig verlaufende Falten wurde die Oberfläche der Kolonie in einzelne Sektoren zerlegt, die an die sog. „Ströme" an den Riesenkolonien der Kulturhefen und vieler wilder Hefen erinnerten (Taf. II, Fig. 7).

Die Unterseite der zentralen Partie schien mit Anhängen versehen zu sein, welche tief in die Gelatine eindrangen. Ein senkrecht durch die Kolonie geführter Schnitt zeigte aber, daß es sich nicht um Anhänge — Büschel von Zellen — handelte, sondern nur um Falten, welche sackartig ausgebildet und nach oben nahezu geschlossen waren (Taf. II, Fig. 9).

Die Randlinie hatte der Ausbildung der Randpartie entsprechend einen unregelmäßigen Verlauf.

Ein Unterschied der Zellformen gegenüber denen auf Würzegelatine ergab sich nicht.

Form 4.

Der einzige Punkt, in dem ein Unterschied zwischen den Kulturen auf Kartoffelwassergelatine und

*) Über die Bildung der echten „Ströme" s. Will, Anleitung zur biologischen Untersuchung usw., München 1909, S. 111.

denen auf Würzegelatine bemerkbar war, ist der, daß bei den ersteren der durch das Luftmycel gebildete Flaum weniger dicht als bei den letzteren war, aber ziemlich gleichmäßig die Oberfläche der Kolonie überzog. Im übrigen deckten sich alle Erscheinungen mit denen bei den Würzegelatinekulturen (Taf. II, Fig. 8).

3. Rübenwassergelatine.

Form 1.

Die Kolonien entwickelten sich anfänglich ebenso wie auf Würzegelatine. Nach etwa 14 Tagen war eine kleine zentrale Partie etwas eingesenkt, die Randpartie durch radial verlaufende Furchen in eine Anzahl von Sektoren geteilt. Der Verlauf der Randlinie mit Einbuchtungen entsprach der Ausbildung der Randpartie.

Farbe und Beschaffenheit der Kolonie sowie die Form und Größe der Zellen waren ebenso wie bei Würzegelatinekulturen.

Form 2.

Die 14 Tage alte Kolonie hatte einen Durchmesser von ca. 9 mm. Die Oberfläche war rauh, körnig, der Rand nicht körnig; er erschien radial gerippt.

Form 3 und Form 4.

Diese beiden Formen wachsen auf Rübenwassergelatine genau so wie auf Würzegelatine.

4. Kartoffeln.

Auf Kartoffelstückchen, die wie früher angegeben vorbereitet waren, wurde mit der Platinöse ein Impfstrich von den zu untersuchenden vier Organismen

aufgetragen. Die Kulturen wurden im Laboratorium (ca. 18° C) aufgestellt.

Form 1.

Der Strich war am 6. Tag gut entwickelt. Unterer Teil stark verbreitert, Rand gelappt. Die Oberfläche dicht mit kleinen, warzenförmigen Erhöhungen bedeckt. Farbe ziegelrot. Im obersten Teil, wo das Kartoffelstückchen sehr dünn war, Strich in kleine,

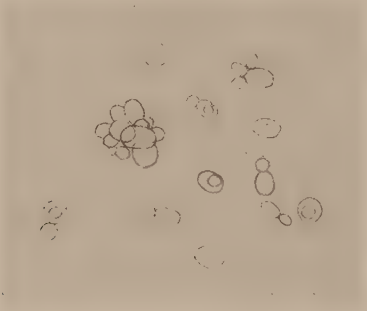


Fig. 48. *Form 2.* 6 Tage alte Strichkultur auf Kartoffel bei 25° gewachsen. Vergr. $\frac{635}{1}$.

zum Teil 1 mm hohe, hellrosa gefärbte Kolonien aufgelöst.

Die Zellen, welche den Hauptteil des Belages zusammensetzen, zeichneten sich durch starke Vacuolisierung aus. Ferner enthielten sie viele, oft sehr große, manchmal eckige Fetttröpfchen. In einer 13 Tage alten Kultur fanden sich schon sehr viele tote Zellen vor.

In den hellrosa gefärbten, isolierten Wärzchen am 4. Tag Zellen stark deformiert. Fetttröpfchen in geringer Anzahl, sehr klein (vergl. S. 35 u. f., sowie Fig. 22). Am 13. Tag wurden in den Wärzchen auffallend viele Riesenzellen gefunden, welche zum Teil

kugelförmig waren, zum Teil aber unregelmäßige Formen besaßen. Eine große Anzahl Zellen war tot. In manchen Zellen enthielten die Vacuolen sog. Tanzkörperchen (Fig. 21).

Form 2.

Am 6. Tag Strich, der in seinem unteren Teil nur wenig verbreitert war, auffallend dick; Rand scharf

Fig. 49. *Form 3.* 7 Tage alte Strichkultur auf Kartoffel bei 25° gewachsen. Vergr. $\frac{635}{1}$.

abgesetzt. Die anfänglich im oberen Teil vorhandenen isolierten, hellrosa gefärbten Wärzchen vollständig mit dem übrigen lachsfarbigen Belag verschmolzen.

Im zentralen Teil des Striches fast alle Zellen sehr groß und nahezu kugelförmig; stark vacuolisiert. Einzelne Zellen enthielten große Mengen von Fett (Fig. 26). Tote Zellen reichlich vorhanden. In dem etwas heller gefärbten Rand Zellen von normaler Größe. Inhalt wenig differenziert. Die Zellen ließen sich nur schwer in Wasser verteilen und blieben oft in maulbeerförmigen Anhäufungen vereinigt (Fig. 48).

Form 3.

Die Oberfläche des Striches am 2. Tag matt, mit zahlreichen Wärzchen bedeckt; hellrosa gefärbt. Einige der Wärzchen wurden nach und nach sehr hoch. Der Belag begann sich sehr fein zu fälteln. Am 6. Tag Fältelung sehr stark, die einzelnen Falten aber immer noch sehr fein. Farbe hellrosa, im obersten Teil nahezu in weiß übergehend.

In einer 7 Tage alten Kultur hatten die Zellen im allgemeinen das Aussehen der auf Würzegelatine gewachsenen (Fig. 29 und 49). Nach weiteren 7 Tagen wurden in dem Belag kugelförmige Zellen, welche in größeren Haufen zusammen lagen und in eine hautartige Masse eingebettet waren, zahlreich angetroffen. Bei isoliert liegenden Zellen konnte öfters beobachtet werden, daß sich eine äußere Schicht der Zellhaut abgelöst hatte (Fig. 32). Ein großer Teil der Zellen war tot.

Form 4.

Bei dieser Form ergab sich weder hinsichtlich der Wachstumserscheinungen, noch bezüglich des Aussehens der Zellen irgend ein Unterschied gegenüber den auf Würzegelatine gewachsenen Kulturen.

C. Biologisches und Physiologisches.

I. Widerstandsfähigkeit der vier Organismen gegen Erhitzen.

Die Widerstandsfähigkeit der Organismen gegen Erhitzen kann im Zusammenhalt mit anderen Eigenschaften auch ein brauchbares diagnostisches Merkmal abgeben.

Die Erhitzungsversuche wurden in der von Will*) angegebenen Weise ausgeführt. Mit 10 ccm steriler Würze beschickte und mit Wattepfropfen versehene Reagenzröhrchen wurden mit 5 Tropfen Einsaatmaterial geimpft. Als solches dienten 21 Tage alte Würzekulturen, die bei Zimmertemperatur in Freudenreichkölbchen herangewachsen waren. Vor der Entnahme des Materials wurden die Kulturen kräftig geschüttelt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung herbeizuführen. Die beimpften Reagenzgläser wurden dann im Wasserbad langsam auf die gewünschte Temperatur gebracht und bei dieser eine halbe Stunde lang gehalten. Die Kulturen erhielten ihren Platz im Thermostaten bei 25° C, um zu beobachten, ob und wann eine Entwicklung bemerkbar wird. Gleichzeitig wurden Kontrollkulturen, die nicht erhitzt waren, aufgestellt.

Das Ergebnis des Versuches ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Form 1				Form 2				Form 3					Form 4			
Temperatur in C°, bei welcher ½ Std. lang erhitzt wurde	45°	50°	55°	60°	45°	50°	55°	60°	45°	50°	55°	60°	65°	45°	50°	55°	60°
Entwicklung nach Tagen	4	—	—	—	2	4	—	—	2	6	7	7	—	6	—	—	—

Die Abtötungstemperaturen liegen also

bei Form 1 zwischen 45° und 50°
„ „ 2 „ 50° „ 55°
„ „ 3 „ 60° „ 65°
„ „ 4 „ 45° „ 50°

*) Mitgeteilt in: Steuber[34]), Beiträge zur Kenntnis der Gruppe *Saccharomyces anomalus*.

II. Wachstumsgrenzen bei höherer und niederer Temperatur.

Zur Ermittelung der Wachstumsgrenzen bei höherer und niederer Temperatur erhielten Freudenreichkölbchen mit steriler Würze je 1 Platinöse voll von den aus kräftigen Würzekulturen stammenden Organismen geimpft. Die Kulturen wurden dann bei 30° C und um je 1° ansteigend bis zu 40° (höhere Temperaturen standen nicht zur Verfügung), sowie bei 9—10° und 0—2° aufgestellt. Zeigte sich bei einer bestimmten Temperatur nach Verlauf von 10—14 Tagen noch keine Entwicklung, so brachte man die betreffenden Kulturen zu 25° C, um zu sehen, ob eine Abtötung der Zellen erfolgt sei.

Nach oben hin lagen die Wachstumsgrenzen

für die Form 1 bei 31°
„ „ „ 2 „ 33°
„ „ „ 3 „ 36°
„ „ „ 4 „ 33°

Bei 25° zeigte sich noch Entwicklung, nachdem die Kulturen zuerst gestanden haben

bei 32° Form 1
„ 40° „ 2
„ 40° „ 3
„ 34° „ 4

Bei diesen Versuchen zeigte es sich, daß die Organismen durchwegs schon bei niedrigerer Temperatur abgetötet wurden, als beim halbstündigen Erhitzen im Wasserbad. Zum Teil liegt der Grund für diese Erscheinung jedenfalls in der verschieden großen Aussaat (5 Tropfen beim halbstündigen Erhitzen im Wasserbad, 1 Platinöse bei den Versuchen zur Ermittlung der Wachstumsgrenzen) und in der längeren (10—14 Tage) Einwirkung der höheren Temperatur.

Nach unten konnten die Wachstumsgrenzen nicht festgestellt werden, denn sowohl bei 9—10° (Eiskasten), als auch bei 0—2° (Hopfenkonservierungsraum einer Brauerei) fand noch kräftige Entwicklung statt.

Soweit bei den außergewöhnlichen Temperaturen eine Veränderung in der Form und Beschaffenheit der Zellen zu beobachten war, ist dessen schon früher Erwähnung getan.

III. Entwicklungshemmung und Abtötung der vier Organismen durch Zusatz von Äthylalkohol zur Nährlösung.

Wie die Untersuchungen von Dachs[4]), Leberle[22]) und Geiger[10]) gezeigt haben, ist das Verhalten der Sproßpilze gegenüber Äthylalkohol für die Unterscheidung größerer Gruppen von Wert. Die Wechselwirkung zwischen Alkohol und Organismen zeigt sich nach drei Richtungen hin: einmal in den Werten derjenigen Mengen, welche unter gegebenen Verhältnissen die Vermehrung der Zellen verhindern, ohne diese abzutöten, zweitens in den Zahlen derjenigen Mengen, welche unter denselben Verhältnissen schließlich die Zellen zum Absterben bringen und drittens in dem Abbau und der Verwertung des Äthylalkohols als Nahrung, also in ernährungsphysiologischer Richtung.

Zunächst wurden nur Versuche nach den beiden ersten Richtungen hin ausgeführt.

Für die Bestimmung der Grenzwerte fällt möglicherweise auch die Zusammensetzung der Nährlösung ins Gewicht. Die Versuche von Dachs haben allerdings für Hefenwasser und Peptonlösung keine Unterschiede ergeben, jedoch bleibt für Reinhefenbier als Nährlösung diese Möglichkeit noch offen. Zu den

Versuchen wurde nur die Peptonlösung, deren Zusammensetzung auf Seite 28 angegeben ist, verwendet. Sie war in Mengen von je 100 ccm auf Pasteurkolben abgefüllt. Die Kolben erhielten Zusätze von Äthylalkohol in steigenden Mengen und zwar immer um je 1 Prozent.

Eingeimpft wurde je eine Platinöse voll von den auf schräg erstarrter Würzegelatine innerhalb 3 Wochen bei 15—20° C herangezüchteten Organismen. Die geimpften Peptonlösungen waren 76 Tage lang im Laboratorium (18—22° C) aufgestellt.

Die Grenzwerte für die Vermehrungsfähigkeit sind folgende:

Form	1	5% Alkohol
„	2	5% „
„	3	6% „
„	4	6% „

Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurde die Peptonlösung von den Kulturen, in welchen keine Entwicklung stattgefunden hatte, abgegossen und durch gehopfte Bierwürze ersetzt, um zu prüfen, ob die Zellen in jenen Kulturen während der Beobachtungszeit abgestorben waren, oder ob sie sich etwa nur in einem Erstarrungszustand befanden, der sie am Aussprossen verhinderte. Trat nach 14 Tagen keine Entwicklung mehr ein, so wurde angenommen, daß eine vollständige Abtötung des eingeimpften Organismus stattgefunden habe.

Als Grenzwerte für das Erlöschen des Lebens unter den eingehaltenen Bedingungen wurden folgende Zahlen ermittelt:

für Form	1	14% Alkohol
„ „	2	14% „
„ „	3	7% „
„ „	4	8% „

Die Grenzwerte für die Hemmung der Vermehrung liegen also für Form 1 und 2 bedeutend niedriger als diejenigen für die Abtötung, für Form 3 und 4 bewegen sie sich auf etwa gleicher Höhe.

Die von Dachs[4]) bei Verwendung von Peptonlösung gefundenen Werte für die Verhinderung der Vermehrung bei den von ihm untersuchten Organismen der I. Untergruppe der Torulaceen bewegen sich zwischen 4 und 6%. Diesen Werten nähern sich die für Form 1 und 2 gefundenen, welche Formen, wie gezeigt wurde, in so vielen Beziehungen Ähnlichkeit mit den Torulaceen der I. Untergruppe aufweisen.

Für die von Leberle[22]) untersuchten Mycodermaarten und -varietäten sind bei Anwendung von Hefenwasser Werte von 6—11%, also viel höhere gefunden worden. Geiger[10]) stellte für seine Pseudomoniliaarten die Grenzwerte bei Verwendung von 10-prozentiger Braunbierwürze mit 5—7% fest.

IV. Verhalten der vier Organismen gegen organische Säuren.

Durch den im folgenden beschriebenen Versuch sollte festgestellt werden, ob unter den eingehaltenen Bedingungen die dargebotenen organischen Säuren durch die vier Organismen angegriffen werden.

Zur Verwendung kamen Weinsäure, Zitronensäure, Apfelsäure, Bernsteinsäure, Essigsäure und Ameisensäure.

Versuche über die Grenzwerte für die Widerstandsfähigkeit gegenüber den genannten Säuren fehlen zur Zeit noch. Deshalb wurde zunächst für Weinsäure, Zitronensäure, Apfelsäure, Bernsteinsäure und Ameisensäure eine Lösung von 0,5% gewählt, die nach den mit anderen Organismen gemachten Erfahrungen zu-

meist noch eine gute Entwicklung zulassen. Nur von der Essigsäure, mit welcher schon von Dachs[4]) ungünstige Erfahrungen gemacht worden waren, kam schon von Anfang an eine Lösung von nur 0,25% zur Anwendung. Die Bereitung der Lösung erfolgte in der Weise, daß einer Peptonlösung von der Seite 28 angegebenen Zusammensetzung ca. 0,5% bezw. 0,25% der Säuren zugesetzt wurden. In diesen mit Weinsäure, Zitronensäure, Apfelsäure und Bernsteinsäure versetzten Nährlösungen entwickelten sich die vier Organismen so gut, daß auch eine Einwirkung auf die Säuren erwartet werden konnte. Der Gehalt an Essigsäure und Ameisensäure erwies sich jedoch als zu hoch. Hier fand keine Entwicklung statt. Der Versuch wurde daher mit diesen beiden Säuren wiederholt, indem Essigsäure und Ameisensäure zu der angegebenen Nährlösung in solchen Mengen zugesetzt wurde, daß von jener eine 0,08 prozentige, von dieser eine 0,2 prozentige Lösung entstand. Bei Ameisensäure blieb jedoch auch bei dieser Verdünnung eine Entwicklung der Organismen aus.

Die Säurelösungen waren in Mengen von 100 ccm auf Pasteurkölbchen abgefüllt worden. Nach halbstündiger Sterilisierung der Pasteurkölbchen im strömenden Dampf wurde der Säuregrad durch Titration mit $\frac{n}{10}$ Natronlauge, unter Anwendung von Phenolphtalein als Indikator, genau ermittelt. Zur Titration der sterilisierten Lösung dienten in jeder Versuchsreihe zwei Pasteurkölbchen, welche wie die übrigen behandelt, aber nicht geimpft worden waren.

Von der Grundlösung (Pepton-Nährlösung), die in der ersten Versuchsreihe Anwendung fand, verbrauchten 10 ccm 4,0 ccm $\frac{n}{10}$ Natronlauge, von der zur Wiederholung des Versuchs mit Essigsäure und Ameisen-

säure benützten 10 ccm 4,6 ccm $\frac{n}{10}$ Natronlauge zur Neutralisation.

Nach Zusatz der Säuren zur Pepton-Nährlösung und nach dem Sterilisieren verbrauchten je 10 ccm der Lösungen:

Weinsäure	10,60	ccm $\frac{n}{10}$	Natronlauge
Zitronensäure	10,90	„	„
Apfelsäure	10,80	„	„
Bernsteinsäure	12,40	„	„
Essigsäure	6,00	„	„
Ameisensäure	9,20	„	„

Von diesen Zahlen sind je 4,0 bezw. bei Essigsäure und Ameisensäure 4,6 ccm abzuziehen, entsprechend dem ursprünglichen Säuregrad der Peptonlösungen. Der Gehalt an zugesetzten Säuren ergibt sich dann zu

0,4950% bei Weinsäure
0,4830% „ Zitronensäure
0,4556% „ Apfelsäure
0,4956% „ Bernsteinsäure
0,0840% „ Essigsäure
0,2116% „ Ameisensäure

Das Impfmaterial für die Doppelversuche mit jedem Organismus lieferten gut entwickelte, etwa 3 Wochen alte Kulturen auf schräg erstarrter Würzegelatine. Jeder Kolben erhielt von jenem eine Platinöse voll. Die Kulturen standen bei Zimmertemperatur von 18—22° C.

Nach 54 Tagen wurde der Versuch abgebrochen. Von den klar vom Bodensatz abgegossenen Nährlösungen wurden wieder je 10 ccm mit $\frac{n}{10}$ Natronlauge titriert. Die Kontrollkulturen zeigten gute Uebereinstimmung. Das Ergebnis der Untersuchung ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

Säure	Ursprünglicher Säuregehalt von 10 ccm ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$ NaOH	Form 1		Form 2		Form 3		Form 4	
		Nach Abbruch des Versuchs ccm $\frac{n}{10}$ NaOH	Abnahme ccm	Nach Abbruch des Versuchs ccm $\frac{n}{10}$ NaOH	Abnahme ccm	Nach Abbruch des Versuchs ccm $\frac{n}{10}$ NaOH	Abnahme ccm	Nach Abbruch des Versuchs ccm $\frac{n}{10}$ NaOH	Abnahme ccm
Weinsäure	10,6	6,5	4,1	8,1	2,5	9,5	1,1	8,6	2,0
Zitronensäure	10,9	6,2	4,7	6,0	4,9	3,6	7,3	8,8	2,1
Apfelsäure	10,8	6,1	4,7	5,0	5,8	3,1	7,7	7,2	3,6
Bernsteinsäure	12,4	9,0	3,4	5,4	7,0	2,6	9,8	10,5	1,9
Essigsäure	6,0	2,6	3,4	1,8	4,2	2,2	3,8	3,1	2,9
Ameisensäure	9,2	9,2	—	9,2	—	9,2	—	9,2	—

Die stärkste Abnahme des Säuregrades zeigen die mit Form 3 geimpften Kulturen, ausgenommen bei Zusatz von Weinsäure, von der jene Form überhaupt die geringste Menge verbraucht hat. Die niedrigsten Zahlen für die Abnahme des Säuregrades finden sich bei der Form 4.

Von der Form 1 wurden Zitronensäure und Apfelsäure am stärksten angegriffen. Im großen und ganzen sind jedoch die Unterschiede zwischen den einzelnen Säurelösungen nicht groß. Der Versuch mit Essigsäure kann nicht direkt zum Vergleich herangezogen werden, da die Säure in viel stärkerer Verdünnung angewendet wurde und damit doch etwas andere Bedingungen als bei den Versuchen mit den anderen Säuren geboten waren.

Durch Form 2 wurde die Weinsäure am wenigsten angegriffen. Es folgen dann in aufsteigender Linie Zitronensäure, Apfelsäure und Bernsteinsäure.

Form 3 verbrauchte am wenigsten Weinsäure; es folgten dann Zitronensäure, Apfelsäure, Bernsteinsäure.

Bei Form 4 ist der Säurerückgang bei der Bernsteinsäure am geringsten; weiterhin folgen Weinsäure, Zitronensäure, Apfelsäure.

Bei obenstehenden Ausführungen wurde angenommen, daß die Organismen nur die zugesetzte organische Säure angegriffen haben. Diese Voraussetzung trifft aber jedenfalls nur zum Teil zu. Denn als eigentlicher Nährboden dient den Organismen doch die Peptonlösung. Deren Zusammensetzung und damit ihr ursprünglicher Säuregrad ist durch die kräftige Vermehrung der Organismen und den zu jener notwendigen Stoffverbrauch verändert worden. Ferner ist in Berücksichtigung zu ziehen, daß möglicherweise von den Organismen selbst sauer reagierende Umsatz-

produkte erzeugt worden sind. Die Zahlen, welche die Säureabnahme angeben, sind also höchstwahrscheinlich das Ergebnis aus verschiedenen Faktoren. Wieviel von der Abnahme des Säuregrades auf den Verbrauch der zugesetzten Säure und wieviel auf die Säureabnahme der Grundlösung trifft, läßt sich ohne zahlreiche und umständliche quantitative Bestimmungen nicht ermitteln. Ein Weg die richtigen Zahlen für den Verbrauch der den Grundlösungen zugesetzten Säuren zu erhalten, scheint zunächst darin gegeben zu sein, daß man neben den Kulturen mit Säurezusatz auch solche mit der Pepton-Nährlösung allein anlegt und dabei die Abnahme des Säuregrades in diesen feststellt. Dem steht aber entgegen, daß durch den Zusatz der Säuren die Pepton-Nährlösung dadurch wesentlich verändert wird, daß bei dem Zusatz der Säuren Niederschläge entstehen. Es dürfte daher nicht angängig sein, die Zahl für die Säureabnahme, welche für reine Peptonlösung gefunden wurde, ohne weiteres auf die durch Säurezusatz in ihrer Zusammensetzung wesentlich veränderte Lösung zu übertagen.

In denjenigen Fällen, in welchen die gefundene Gesamtsäureabnahme sehr nahe dem Säuregrad der Peptonlösung steht oder sogar noch unter jenem bleibt, kann also nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die zugesetzte Säure überhaupt angegriffen wurde.

Die Antwort auf die Fragestellung, welche organischen Säuren durch die vier Organismen abgebaut werden, ist also eindeutig, und zwar im bejahenden Sinn nur für Zitronensäure, Apfelsäure und Bernsteinsäure bezüglich der Formen 1, 2 und 3 gegeben worden.

In den mit Ameisensäure versetzten Lösungen kam keiner der vier Organismen zur Entwicklung, die Formen 2 und 4 wurden sogar völlig abgetötet. Zur Ermittlung dieser Tatsache wurde, nachdem der

Säuregrad der Lösungen bestimmt worden war, die Pepton-Säure-Lösung abgegossen und durch Würze ersetzt. Im Verlauf von 5—14 Tagen entwickelten sich dann noch die Formen 1 und 3.

Daß die Ameisensäure sich als Gift für die vier Organismen erwies, steht völlig im Einklang mit den Beobachtungen von Seifert, welcher mit Ameisensäure Versuche gemacht hat, die bezweckten, die Brauchbarkeit der Ameisensäure alsAntiseptikum gegenüber Hefe und anderen im Weine vorkommenden Organismen festzustellen[33]). Tatsächlich erwies sich dabei die antiseptische Wirkung der Ameisensäure als ziemlich bedeutend.

V. Verhalten der vier Organismen gegen verschiedene Zucker.

Das Verhalten der vier Organismen gegen verschiedene Zucker wurde zunächst mittelst der sog. Kleingärmethode nach Lindner[25]) geprüft. Zur Anwendung kamen: Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Milchzucker, Maltose, ferner Arabinose, Xylose und Methylglukosid. Bei keinem der verwendeten Zucker und bei keinem der vier Organismen zeigten sich Gärungserscheinungen.

Die Untersuchungen von Dachs[4]) haben ergeben, daß der Kleingärmethode nur der Wert eines orientierenden Versuches zukommt. Um daher mit Sicherheit festzustellen, daß in der bei der Kleingärmethode angewendeten Nährlösung keiner der vier Pilze Zucker in Alkohol und Kohlensäure spaltet, wurden mit Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose und Milchzucker Gärversuche in größerem Maßstabe durchgeführt. Wenn die Frage gelöst werden soll, ob den vorliegenden Organismen das Gärvermögen, welches

unter anderem auch von der Zusammensetzung der Nahrung, besonders der Qualität der Stickstoffnahrung abhängig zu sein scheint, überhaupt abgeht, dann müßte der Gärversuch in der verschiedensten Weise variiert werden.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß in der üblichen Weise hergestelltes Hefenwasser einen Zusatz von 6% der angegebenen Zuckerarten erhielt. Die Zuckerlösungen wurden in Mengen von je 100 ccm auf Pasteurkolben abgefüllt und nach dem Sterilisieren im strömenden Dampf mit je einer Platinöse voll des Einsaatmateriales beimpft. Dieses war auf schräg erstarrter Würzegelatine bei ca. 15—16° C während 3 Wochen herangezüchtet worden. Die geimpften Hefenwasserkulturen standen 8 Wochen lang bei 18 bis 22° Celsius.

Die an den Kulturen beobachteten Wachstumserscheinungen sind Seite 68 u. f. zusammengestellt. Aeußerlich sichtbare Gärungserscheinungen traten nicht auf.

Nach Abschluß des Versuches wurde die Reinheit der Kulturen mikroskopisch geprüft.

Die Alkoholbestimmung geschah in folgender Weise: Der gesamte Inhalt des Kulturkolbens wurde in einen Destillierkolben gegossen und dann jener noch mit 25 ccm Wasser ausgespült. Von den erhaltenen 125 ccm Flüssigkeit wurden ca. 75 ccm abdestilliert und das Destillat mit Wasser auf 100 ccm gebracht. Dann wurde im Destillat mittelst der Jodoformreaktion auf Alkohol geprüft.

Sämtliche Destillate wiesen den an Fleischextrakt erinnernden Geruch, der bei der Bereitung von Hefenwasser zu bemerken ist, auf.

Alkohol konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Zwar wurde stets ein schwacher Geruch nach

Jodoform wahrgenommen, aber niemals entstand auch nur eine Spur eines Niederschlags.

Durch den Versuch ist also mit Sicherheit festgestellt worden, daß unter den eingehaltenen Bedingungen keiner der vier Organismen befähigt ist, Zucker in Alkohol und Kohlensäure zu spalten.

VI. Der rote Farbstoff.

Die Mehrzahl der orangegelb und rot gefärbten Pilze sowie die in gleicher Weise gefärbten Gewebe höherer Pflanzen enthalten Farbstoffe aus der Gruppe der Karotine, welche ihre Benennung nach dem Vorkommen eines typischen Vertreters in der Möhrenwurzel *(Daucus Carota)* erhalten haben[3]). Das Vorkommen der Karotine ist sogar nicht nur auf gelbe und rote Organe beschränkt, sie finden sich reichlich auch in grünen Teilen als Bestandteile der Chloroplasten[7]). Janssens und Mertens[16]) haben schon für die von ihnen untersuchte Torula Nr. 36 Karotin als färbende Substanz angesprochen.

Zeise[3]) stellte für das Möhren-Karotin die Formel $10(C_5H_8)$ auf. Husemann[3]) fand jedoch in seinem Präparat 6% Sauerstoff und gab ihm daher die Formel $C_{18}H_{24}O$. Durch Arnauds[1]) sorgfältige Untersuchungen wurde aber schließlich festgestellt, daß es sich doch um einen, allerdings sehr leicht oxydablen Kohlenwasserstoff handle. Er stellte die Formel $C_{26}H_{38}$ auf und schlug vor, den Namen in „Karoten" umzuändern. Willstätters[7]) Untersuchungen zufolge ist die Formel für Karoten $C_{40}H_{56}$. Es liefert ein Jodadditionsprodukt $C_{40}H_{56}J_2$.

Da, wie erwähnt, das Karoten im Pflanzenreich sehr häufig auftritt und Janssens und Mertens bereits für einen roten Sproßpilz die Gegenwart von

Karoten annehmen, war es naheliegend, daß auch bei den hier beschriebenen Pilzformen Karoten das färbende Prinzip sei. Das Auftreten der Lipocyanreaktion (s. Abschn. „Spezielle Morphologie") bei den Formen 1 bis 3 machte jene Annahme fast zur Gewißheit.

Die im folgenden beschriebene eingehendere Untersuchung wurde mit dem Farbstoff der Form 1 ausgeführt, da diese die größte Menge bildet.

Um den Farbstoff aus den Zellen auszuziehen, wurden Absatz und Oberflächenvegetation einer gut entwickelten Würzekultur zunächst auf eine Gipsplatte aufgetragen, um auf diese Weise die Zellen von der Nährflüssigkeit zu trennen, da sich eine Filtration nicht ausführen ließ. An dieser Stelle mag nochmals darauf hingewiesen sein, daß sich der Farbstoff in Form von großen öligen Kugeln auch in der Nährlösung ansammelt. Nach 24 Stunden konnte die eine zähe, dünne, braune Haut bildende trockene Masse von der Gipsplatte abgeschabt werden. Diese Masse wurde dann in einer Reibschale mit Quarzsand verrieben. Das Zerreiben muß ziemlich lange Zeit fortgesetzt werden, um möglichst viele Zellen zu zerreissen.

Das so erhaltene rosa gefärbte Pulver wurde in einem mit Glasstöpsel verschließbaren Zylinder mit Schwefelkohlenstoff übergossen und blieb unter öfterem Umschütteln längere Zeit stehen. Man erhielt so eine tief dunkelrot gefärbte Lösung, die durch Filtration vom Rückstand getrennt wurde. Der Rückstand wurde dann noch durch wiederholte Behandlung mit Schwefelkohlenstoff erschöpft.

Die Anwendung des Soxhletschen Extraktionsapparates erwies sich als unzweckmäßig, da schon nach kurzer Zeit die Poren der Filtrierpapierhülse verstopft waren und die Farbstofflösung nicht mehr

durchging. Die Flüssigkeit in der Hülse war dann dunkelrot gefärbt, während in das Kölbchen nur eine schwach rosa gefärbte Lösung ablief.

Nach Verjagen des Schwefelkohlenstoffes blieb eine geringe Menge einer dunkelrot gefärbten Masse von fettartiger Konsistenz zurück. Diese Masse enthält neben dem Farbstoff Phytosterin und Fett. Zur Entfernung der Fette wurde die Masse mit alkoholischer Natronlauge verseift, dann die Natronseifen mit Calciumchlorid in unlösliche Kalkseifen übergeführt. Nach dem Erkalten wurde der Seifenbrei im Scheidetrichter mit Petroläther ausgeschüttelt. Der Farbstoff und die Phytosterine gehen dabei in Lösung[29]).

Der nach dem Verdunsten des Petroläthers verbleibende Rückstand ist orangerot gefärbt und von fettartiger Beschaffenheit. Da die Ausbeute an Substanz sehr gering war, konnte eine Trennung des Farbstoffes von den Phytosterinen (durch Umkristallisieren aus kochendem Aceton und Methylalkohol; beim Erkalten soll Karoten in Lösung bleiben[3]) nicht durchgeführt werden.

Das so erhaltene Produkt ist sehr unbeständig. Schon nach einigen Tagen ist die rote Farbe in eine grünlichgelbe übergegangen. Besonders rasch vollzieht sich die Veränderung bei Einwirkung von Luft und Licht. Sowohl die rote als auch die ausgebleichte Masse geben die Cholestearinreaktionen (Hesse, Liebermann). Für Karoten wird dieselbe Eigenschaft angegeben.

Mit dem unreinen Produkt wurden verschiedene von Husemann[15]) angegebene Reaktionen auf Karoten ausgeführt, die ein positives Ergebnis hatten.

1. Von konzentrierter Schwefelsäure wird die Substanz mit schön purpurblauer Farbe (die durch Einwirkung von Luft und Licht veränderte Masse mit

Umbrafarbe) gelöst und durch Wasser aus dieser Lösung in dunkelgrünen Flocken wieder abgeschieden.

2. Gasförmige schweflige Säure färbt sie tief indigoblau, wässerige dagegen kaffeebraun; in beiden Fällen stellt Kali die rote Farbe wieder her.

3. Chlor erzeugt mit dem Karoten ein Substitutionsprodukt, das Quadrichlorkaroten, welches durch Ueberleiten von trockenem Chlor über Karoten und Fällen der alkoholischen Auflösung des Produktes mittelst Wasser als weißes amorphes Pulver erhalten wird.

Die rote Farbe der fettartigen Masse ging unter der Einwirkung des Chlors (es wurde eine halbe Stunde lang übergeleitet) zunächst in ein intensives Blaugrün über. Nach und nach wurde die Masse gelblichweiß. Das Reaktionsprodukt war in Alkohol sehr leicht mit schwach grüngelber Farbe löslich. Auf Zusatz von Wasser fiel aus der alkoholischen Lösung ein weißer, amorpher Niederschlag aus.

Reines Quadrichlorkaroten färbt sich beim Erhitzen auf 100° rot und schmilzt bei 120°. Das war nun bei dem aus dem Phytosterin-Karotengemisch erhaltenen weißen Körper nicht der Fall. Dessen Schmelzpunkt lag schon zwischen 30 und 40°. Beim weiteren Erhitzen auf 100° konnte zunächst auch keine Rotfärbung wahrgenommen werden. Erhitzte man aber eine kleine Menge der Substanz vorsichtig auf einem Objektträger, so sah man unter dem Mikroskop kleine, in der geschmolzenen gelblichen Masse verteilte rote Kügelchen.

Wenn es also auch nicht gelang reines Karoten darzustellen, so geht doch aus dem Verlauf der oben angeführten Reaktionen unzweifelhaft hervor, daß der rote Farbstoff, wenigstens der der Form 1, tatsächlich Karoten ist.

D. Kurze Zusammenfassung der durch die Untersuchung festgestellten Artmerkmale.

Stellung der vier Pilze im System.

Form 1.

Zellform ellipsoidisch bis gestreckt ellipsoidisch; Länge durchschnittlich 7—8 μ, Breite 4 μ. Unregelmäßige Zellformen nur bei sehr niederen Temperaturen. Riesenzellen in Würze selten, in Hefenwasser und auf festen Nährböden häufig. Zellhaut verschleimt, ältere Flüssigkeitskulturen infolgedessen fadenziehend. Zellinhalt sehr blaß. Meist zwei stark lichtbrechende Körperchen, welche häufig an den Polen der Zellen gelagert sind. Vermehrung durch Sprossung in Reihen oder wie bei Saccharomyceten; Kronenbildung. Größere Sproßverbände kommen nicht zustande. Einzellkulturen in Würzegelatine: Wachstumstypus III. Auf flüssigen Nährböden Wachstum zwar vorherrschend auf der Oberfläche, jedoch niemals in lückenloser Haut, da die kleinen Hautinselchen sehr bald zu Boden sinken. Riesenkolonien: gleichmäßiger, satt roter, glänzender Belag, Oberfläche glatt oder mit warzenförmigen Erhebungen, keine besondere Struktur. Dextrose, Lävulose, Galaktose und Saccharose werden assimiliert, weniger Milchzucker. Bildung eines hellroten Farbstoffes (Karoten), der bei Gegenwart verschiedener Zucker verschiedene Nuancen zeigt. In älteren Flüssigkeitskulturen, besonders in Würze ölige, gelb gefärbte Tropfen verteilt. Gärvermögen fehlt. Abtötungstemperatur zwischen 45 und 50°. Wachstumsgrenze nach oben 31° (in gehopfter Würze). Grenzwert für die Vermehrungsfähigkeit in alkoholhaltiger Peptonlösung: 5% Alkohol. Grenzwert für das Erlöschen

des Lebens in alkoholhaltiger Peptonlösung: 14% Alkohol. Zitronen- und Apfelsäure werden verhältnismäßig stark, Weinsäure und Bernsteinsäure weniger angegriffen.

Form 2.

Zellform ellipsoidisch, etwas gedrungener wie bei Form 1; Länge durchschnittlich 6—7 μ, Breite 4 bis 4,5 μ. In sehr alten Kulturen und bei sehr niederer Temperatur lange, wurstförmige Zellen. Riesenzellen in Würze selten, in Hefenwasser und auf Kartoffeln häufig. Im Gegensatz zu Form 1 verschleimt die Zellhaut nicht. Zellinhalt sehr blaß. In jüngeren Zellen meist 2 stark lichtbrechende Körperchen (Oeltröpfchen), aber nicht wie bei Form 1 an den Polen der Zelle gelagert, in älteren Zellen meist 3. Die Oeltröpfchen nicht so groß wie die der Form 1. Außerhalb der Zellen kommen solche nicht vor. Vermehrung durch Sprossung in Reihen oder wie bei Saccharomyceten. Sproßverbände selten mehr als 4 Glieder. Kronenbildung. Einzellkulturen in Würzegelatine: Wachstumstypus III, nähert sich jedoch dem Typus II. In flüssigen Nährböden Wachstum vorherrschend auf der Oberfläche. Die Hautinselchen sinken jedoch bald unter. Geschlossene Haut niemals beobachtet. Riesenkolonien: gleichmäßiger, roter Belag, weniger glänzend als bei Form 1; meist glatt; warzige Erhebungen auf der Oberfläche, jedoch nicht in dem Umfang wie bei Form 1. Assimiliert werden Dextrose, Lävulose und Galaktose, weniger gut Saccharose und Milchzucker. Farbstoffbildung (wahrscheinlich Karoten) ausgenommen in Milchzuckerlösung intensiv. Farbe hellblutrot, mit verschiedenen Nuancen wie bei 1. Gärvermögen fehlt. Abtötungstemperatur zwischen 50 und 55°. Wachstumsgrenze nach oben 33° (in gehopfter Würze). Grenzwert für die Vermeh-

rungsfähigkeit in alkoholhaltiger Peptonlösung: 5% Alkohol. Grenzwert für das Erlöschen des Lebens in alkoholhaltiger Peptonlösung: 14% Alkohol. Bernsteinsäure wird verhältnismäßig am stärksten angegriffen, weniger stark Zitronensäure, Apfelsäure und Weinsäure.

Form 3.

Zellen sehr verschiedenartig: 1. lange, fadenförmige, 2,4—7 μ dick, vereinzelt mit Querwänden; an den Enden meist eine scharf abgesetzte ellipsoidische oder nierenförmige Anschwellung; 2. gestreckt ellipsoidische oder nierenförmige, mit keimschlauchartigen Auswüchsen an den verschiedensten Stellen, wodurch sie ein bizarres Aussehen erhalten. Länge 10 bis 11 μ, Breite 3,5—5 μ. Kugelförmige Riesenzellen auf Kartoffel. Zellhaut verschleimt nicht. Zellinhalt sehr blaß. Stark lichtbrechende Körperchen in jüngeren Zellen nur vereinzelt, in älteren dagegen zahlreich, ungleichmäßig verteilt. Vermehrung der ellipsoidischen Zellen anfangs durch Sprossung wie bei Saccharomyceten. Sproßverbände zerfallen sehr bald. Später entwickeln sich aus den ellipsoidischen Zellen fadenförmige; an deren Enden konidienartige, keulen- oder nierenförmige oder ellipsoidische Anschwellungen, die sehr leicht abfallen. Einzellkultur in Würzegelatine: Wachstumstypus III. Gestreckt ellipsoidische Zellen bilden den Kern der Kolonie, aus dem lange, fadenförmige Zellen herauswachsen. Wachstum auf flüssigen Nährböden in Form von Oberflächenvegetation. Riesenkolonien: grob gefalteter, roter, weißbestäubter Belag. Durch Erschütterungen lösen sich Zellen von der Kolonie ab und geben Veranlassung zur Bildung sekundärer Kolonien. Assimiliert Dextrose, Lävulose, Galaktose und Saccharose, weniger gut Milchzucker. Farbstoffbildung in allen

Zuckerlösungen, Milchzucker ausgenommen, intensiv (wahrscheinlich Karoten). Farbe rosa. Gärvermögen fehlt. Abtötungstemperatur zwischen 60 und 65°. Wachstumsgrenze nach oben 36° (in gehopfter Würze). Grenzwert für die Vermehrungsfähigkeit in alkoholhaltiger Peptonlösung: 6% Alkohol. Grenzwert für das Erlöschen des Lebens in alkoholhaltiger Peptonlösung: 7% Alkohol. Bernsteinsäure wird verhältnismäßig am stärksten angegriffen, weniger Apfelsäure, Zitronensäure, Weinsäure.

Form 4.

Zellform: 1. lange, dünne, verzweigte Fäden mit Querwänden, also ein echtes Mycel; 2. gestreckt ellipsoidische, an den Enden abgerundete Zellen von durchschnittlich 7 μ Länge und 3,5 μ Dicke. Keine Riesenzellen. Zellinhalt schwach lichtbrechend. Fetttröpfchen erst in älteren Kulturen; in den Fäden ungleichmäßig verteilt, in den gestreckt ellipsoidischen Zellen häufig an den Polen gelagert. Vermehrung erfolgt durch Sprossung und durch Spitzenwachstum mit Querwandbildung. Aus den gestreckt ellipsoidischen Zellen entwickelt sich zuerst eine gleichgestaltete, die zu einem Mycelfaden auswächst, welcher sich verzweigt. An den Enden der Seitenäste entstehen keulenförmige Verdickungen (Konidien), welche sich abschnüren. An der Abschnürungsstelle sprosst alsbald wieder eine neue Zelle hervor, die nach Erreichung einer bestimmten Größe sich wieder abtrennt. Dieser Vorgang wiederholt sich. Einzellkultur in Würzegelatine: die Kolonie besitzt „Bäumchenform“. Die an den Seitenästen entstehenden ellipsoidischen Zellen fallen zunächst nicht ab, so daß Büschel von 5—6 Zellen vorhanden sind. Wachstumsform auf flüssigen Nährböden in Oberflächenvegetation, zähe, knorpe-

lige Haut. Riesenkolonien: zäher, hautartiger, radial gefalteter Belag; zentrale Partie rot, Rand grau; Oberfläche mit dichtem, weißem Luftmycel bedeckt. Assimiliert werden Lävulose und Milchzucker, weniger Dextrose, Galaktose und Saccharose. Farbstoffbildung bei Gegenwart von Zucker, ausgenommen Milchzucker, ziemlich stark. Farbe rosa, wechselt in der Nuance. Die chemische Natur des Farbstoffes konnte nicht bestimmt werden. Gärvermögen fehlt. Abtötungstemperatur zwischen 45 und 50°. Wachstumsgrenze nach oben 33° (in gehopfter Würze). Grenzwert für die Vermehrungsfähigkeit in alkoholhaltiger Peptonlösung: 6% Alkohol. Grenzwert für das Erlöschen des Lebens in alkoholhaltiger Peptonlösung: 8% Alkohol. Apfelsäure wird verhältnismäßig am stärksten angegriffen, weniger stark Zitronensäure, Weinsäure und Bernsteinsäure.

Unter Hinweis auf die für die Torulaceen charakteristischen Merkmale, welche auf S. 29 und 30 zusammengestellt wurden, ergibt sich unzweifelhaft, daß die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Formen 1 und 2 jener Gruppe von Sproßpilzen angehören. „Die Farbstoffbildung kann jedenfalls kein ausreichender Grund für ihre Abtrennung sein, da wir durch die Beobachtungen von Kossowicz[19]), welche von R. Schander[31]) bestätigt wurden, wissen, daß bei manchen Saccharomyceten, welche unter gewöhnlichen Verhältnissen farblos sind, unter bestimmten Bedingungen (bei Gegenwart von Magnesiumsalzen) ein roter Farbstoff entsteht. Außerdem gibt es typische Torulaformen, welche nur unter gewissen Vegetationsbedingungen in verschiedener Weise, darunter auch rot gefärbt erscheinen. Die Farbstoffbildung ist überhaupt kein konstantes Merkmal[43])."

Nach der gedrungenen Zellform reihen sich die beiden Formen der I. Untergruppe der Torulaceen an. Form 1 soll daher mit dem Namen *Torula rubra*, Form 2 mit *Torula sanguinea* bezeichnet werden. Eine Verwechslung mit anderen, ähnlichen, jedoch mangelhaft charakterisierten Formen, besonders *Saccharomyces ruber* Demme, der wohl richtiger als *Torula rubra* zu bezeichnen wäre, dürfte bei der gegebenen genauen Beschreibung unserer beiden Formen ausgeschlossen sein.

Bei der Form 3 ist die Frage nach der systematischen Stellung schwieriger. Das Mycel herrscht vor, während die Sprossung sehr zurücktritt und nur unter besonderen Verhältnissen (hauptsächlich innerhalb der Gelatine bei Plattenkulturen, bei Luftbeschränkung) auftritt. Es sind die Konidien, welche unter für sie günstigen Bedingungen sprossen und dann ein Mycel bilden, welches Konidien trägt. Unter ungünstigen Bedingungen (z. B. in der Böttcherschen feuchten Kammer, also in mit Wasserdampf gesättigter Luft oder nach Veränderung der Nährlösung) keimen die Konidien sofort aus, und zwar mit Keimschläuchen, die aber dann niemals lang werden. Das Auskeimen kann an verschiedenen Stellen der Konidien vor sich gehen. Die bizarren Formen entstehen teilweise dadurch, daß an mehreren Stellen Keimschläuche gebildet werden, oder daß diese sich verzweigen; wir betrachten sie als abnorme Bildung. An den kurzen Keimschläuchen können gleich wieder Konidien entstehen.

Ohne Zwang läßt sich also die Form 3 keiner der bis jetzt aufgestellten Sproßpilzgattungen angliedern. Am meisten Ähnlichkeit hat sie mit der von Janssens und Mertens untersuchten Form, welche die beiden Autoren als Torula Nr. 36 bezeichnen. Ferner

besteht viel Ähnlichkeit mit *Blastoderma salmonicolor* Fischer und Brebeck. Torula Nr. 36 und *Blastoderma salmonicolor* sowie die untersuchte neue Form sind, soweit sich übersehen läßt, sicher voneinander verschieden, würden sich aber recht wohl zu einer Gattung unter einem besonderen Namen vereinigen lassen. Es könnte vielleicht der von Fischer und Brebeck vorläufig gewählte — *Blastoderma* — beibehalten werden.

Trotzdem soll von der Aufstellung einer neuen Gattung abgesehen und die Form, wie das schon Will[44]) getan hat, einstweilen zur II. Untergruppe der Torulaceen gestellt werden. Jedenfalls dürfte dadurch, daß die Gruppe der fraglichen Organismen vorläufig zu den Torulaceen gestellt und, wenn sich später die Trennung von den Torulaceen unter einem besonderen Gattungsnamen als notwendig erweisen sollte, die vorhandene Verwirrung nicht vergrößert werden, wie das umgekehrt der Fall wäre.

Es besteht die begründete Hoffnung, daß, wenn die letzten von Will eingeleiteten eingehenden Untersuchungen über die Torulaceen publiziert sein werden, dann auch der Versuch gemacht werden soll, auf Grund der bis jetzt gewonnenen Merkmale ein System der Torulaceen aufzustellen[46]).

Die Form 4 gehört der Familie *Mucedinaceae* Link (Hyphomycetes) an, und zwar der III. Unterabteilung *Cephalosporiae* der I. Abteilung *Hyalosporiae*[30]). Sie erhält den Namen *Cephalosporium rubescens.*

Literatur.

1. Arnaud, A., Compt. rend. Tome CII, 1886, S. 1119, 1319.
2. Cohn, Ferd., Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 2. Heft 1872, S. 187.
3. Czapek, F., Biochemie der Pflanzen, Jena 1905, Bd. I, S. 172 u. f.
4. Dachs, J., Dissertation, München 1908. Vergl. auch Will und Dachs, Zentralbl. Bakt., II. Abt. 1908, **21**, S. 386.
5. Demme, R., Zentralbl. Bakt. 1890, **9**, S. 271.
6. Elfving, Oefversigt af Finska Vetensk. Soc. Förh. Bd. 28.
7. Euler, H., Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie. Braunschweig 1908, I. Teil, S. 135.
8. Fischer, B. und Brebeck, K., Zur Morphologie. Biologie und Systematik der Kahmpilze, der Monilia candida und des Soorerregers. Jena 1894.
9. Fresenius, Beiträge zur Mykologie. 1850—1863.
10. Geiger, A., Dissertation, München 1910. Derselbe Zentralbl. Bakt. II. Abt., 1910, **27**, S. 97.
11. Hansen, E. Chr., Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, 1879, 2, S. 81.
12. „ „ Ebenda 1882, Tafel II, Fig. 1—34.
13. „ „ Zeitschr. f. d. ges. Bauwesen, 1889, **12**, S. 265.
14. „ „ Allg. Brauer- u. Hopfen-Zeitung, 1887, **27**, S. 1109.
15. Husemann und Hilger, Die Pflanzenstoffe, Berlin 1884, S. 960.
16. Janssens, F. A. und Mertens, A., La Cellule, 1903, **20**, 2. Fasc. S. 351.
17. Kayser, E., Le Cidre, 1890, **3**, S. 371.
18. Klöcker, A., Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe. Stuttgart 1906, S. 69.
19. Kossowicz, A., Zeitschr. f. d. landwirtsch. Versuchswesen in Österreich, 1902, **6**, S. 27.
20. Laschè, A., Der Braumeister, Chicago, 1892, Nr. 9.
21. Laurent, E., Ann. Pasteur, 1888, **2**, S. 596.
22. Leberle, H., Dissertation, München 1909. Vergl. auch Will und Leberle, Zentralbl. Bakt., II. Abt. 1909, **28**, S. 1.
23. Lindner, P., Wochenschr. f. Brauerei, 1887, **4**, S. 853 (Ref.).
24. „ „ Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 5. Aufl. Berlin 1909, S. 230.
25. „ „ Ebenda S. 275.
26. Mez, C., Mikroskopische Wasseranalyse, Berlin 1898, S. 344.
27. „ „ Ebenda S. 338.

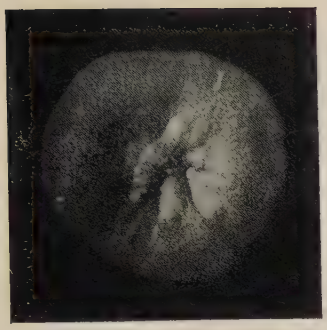
28. Neubauer, O., Münchener med. Wochenschr. 1904, Nr. 25.
29. Neumeister, Lehrbuch der physiologischen Chemie, Jena 1893, I., S. 68 u. 69.
30. Rabenhorsts Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. 2. Aufl., I. Bd., VIII. Abt., S. 103.
31. Schander, R., Jahresber. der Vereinigung der Vertreter der angew. Botanik, 2 Jahrg. 1903/04, S. 104.
32. Schröter, J., Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 2. Heft, 1872, S. 110.
33. Seifert, W., Zeitschr. f. d. landwirtsch. Versuchswesen in Österreich 1904.
34. Steuber, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, 1900, **23**, S. 9.
35. Wehmer, C., Zentralbl. Bakt., II. Abt., 1897, **3**, S. 218.
36. Will, H., Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, 1905, **28**, S. 128.
37. „ „ Anleitung zur biologischen Untersuchung und Begutachtung von Bierwürze usw. München 1909, S. 80.
38. „ „ Ebenda S. 445.
39. „ „ „ „ 446.
40. „ „ „ „ 100.
41. „ „ „ „ 83.
42. „ „ „ „ 108.
43. „ „ Handbuch der technischen Mykologie v. F. Lafar, Jena 1905—1907, Bd. IV, S. 280 u. f.
44. „ „ Ebenda S. 297.
45. „ „ Zentralbl. Bakt., II. Abt, 1907, **17**, S. 76.
46. „ „ Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, 1910, **33**, S. 310.
47. Zopf, W., Die Pilze, Breslau 1890, S. 144.

Erklärung der Tafeln I und II.

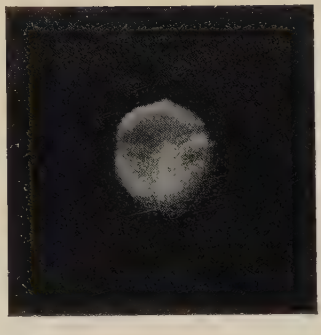
1.—4. Riesenkolonien auf Würzegelatine.
5.—8. „ „ Kartoffelwassergelatine.
1. Form 1: Torula rubra.
2. „ 2: „ sanguinea.
3. „ 3.
4. „ 4: Cephalosporium rubescens.
5. „ 1: Torula rubra.
6. „ 2: „ sanguinea.
7. „ 3.
8. „ 4: Cephalosporium rubescens.
9. Form 3: Senkrechter Schnitt durch eine Riesenkolonie auf Würzegelatine. Zeigt die sackartigen Falten, welche „Anhänge" vortäuschen.
10. „ 3: Riesenkolonie auf Würzegelatine mit Tochterkolonien.
11. Torula Nr. 36 Janssens und Mertens: „Stelle aus einem Spiegel".
12. „ „ „ „ „ „ Riesenkolonie auf Würzegelatine.

Anmerkung. Die Fig. 11 und 12 auf Tafel II, sowie die Textfiguren 11—14 sind Kopien der den angezogenen Abhandlungen der betreffenden Autoren beigegebenen Originalzeichnungen, bezw. Fotografien.

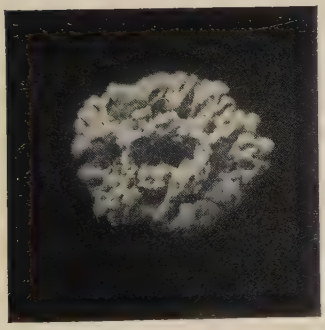
Tafel I.



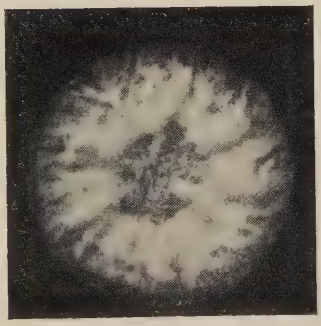
1.



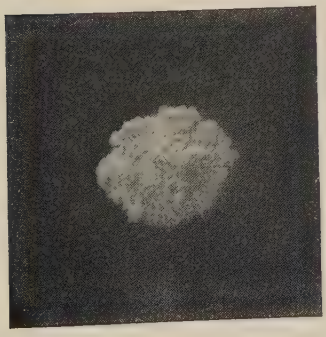
2.



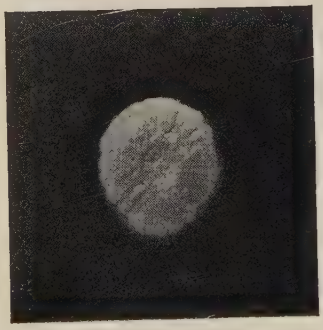
3.



4.

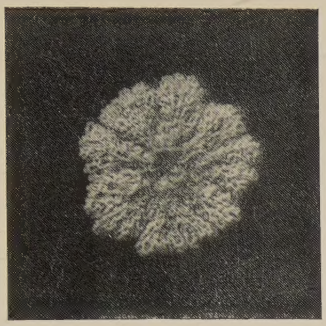


5.

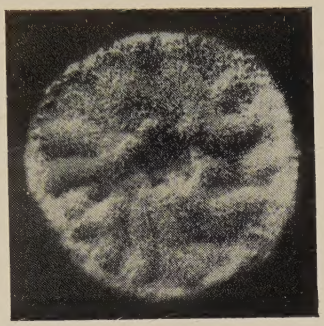


6.

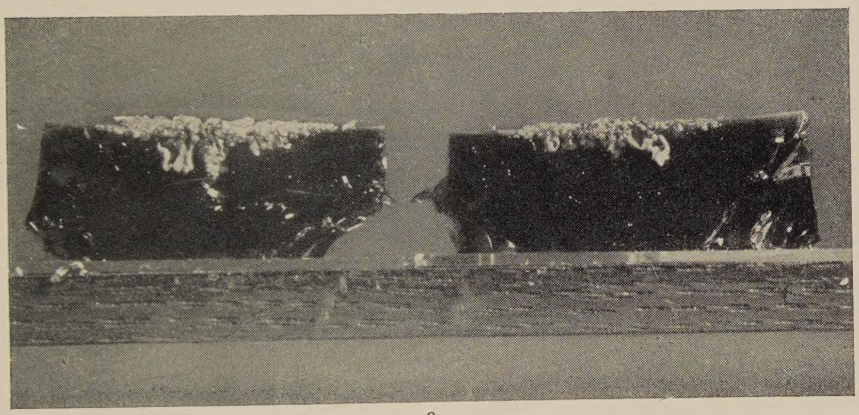
Tafel II.



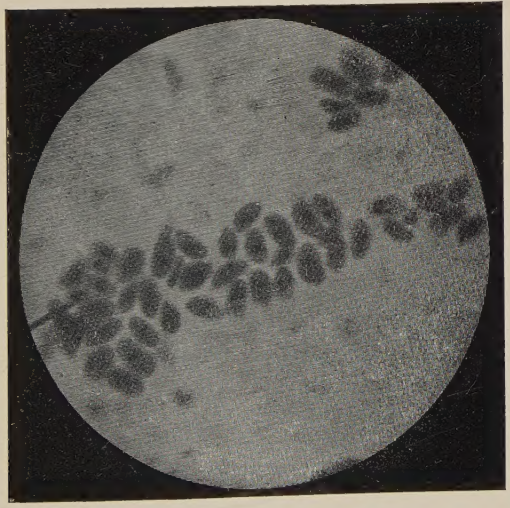
7.



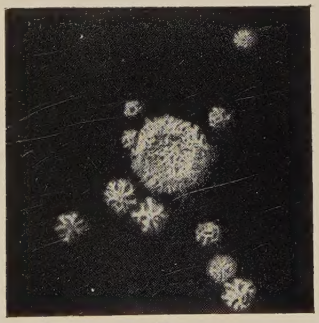
8.

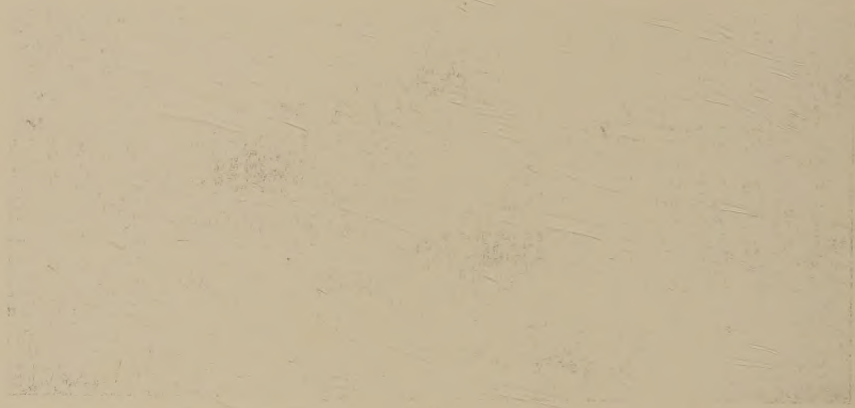
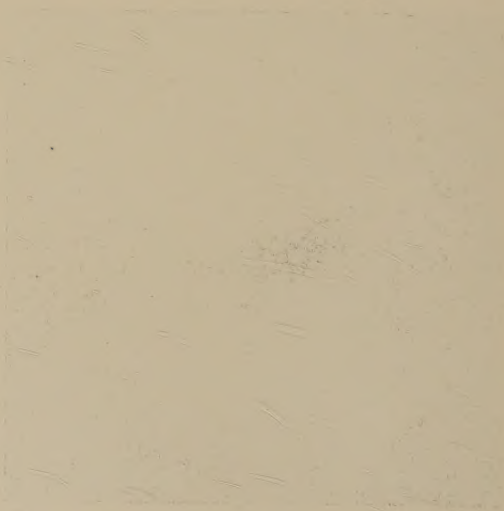
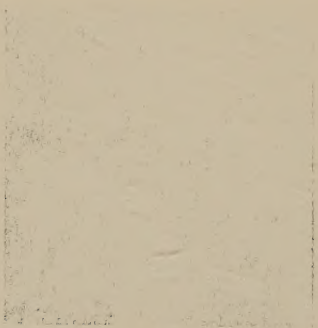


9.



11.



10.

12.